

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ANALYSE DES MÉCANISMES D'ÉCHEC DES ENDOPROTHÈSES COUVERTES ET
STIMULATION DE LA FORMATION NÉOINTIMALE IN VITRO : VERS UN MEILLEUR
TRAITEMENT DES ANÉVRISMES DE L'AORTE ABDOMINALE.

PAR

ANNIE MAJOR

INSTITUT GÉNIE BIOMÉDICAL
UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À LA FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES
EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(EN GÉNIE BIOMEDICAL)

OCTOBRE, 2006

© ANNIE MAJOR, 2006



v1)

4

U58

2007

v.023

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé:
Analyse des mécanismes d'échec des endoprothèses couvertes et stimulation de la
formation néointimale in vitro : vers un meilleur traitement des anévrismes de
l'aorte abdominale

présenté par:
Annie Major

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Aimé Robert LeBlanc
Président rapporteur

Sophie Lerouge
directeur de recherche

Marie-Josée Hébert
codirecteur de recherche

Gregory De Crescenzo
Membre du jury

RÉSUMÉ

Dans les pays industrialisés où la prévalence et le risque chirurgical des anévrismes de l'aorte abdominale (AAA) augmentent dans la population vieillissante, la réparation endovasculaire des anévrismes avec une endoprothèse couverte (EC) offre une alternative minimalement invasive. Cette approche innovante est malheureusement limitée par de nombreuses complications.

Ce projet se divise en deux parties distinctes. Premièrement, nous avons analysé des EC explantées ainsi que leur interface avec les tissus environnant pour acquérir une meilleure compréhension des mécanismes d'échec. Nous avons démontré que la dégradation de l'implant est toujours un problème et que la guérison tissulaire autour des EC est déficiente. Les facteurs qui peuvent expliquer cette mauvaise guérison sont présentés.

Ces résultats ont menés à la seconde partie de ce travail : explorer le potentiel d'un nouveau revêtement riche en azote, appelé le PPE:N, polymérisé par plasma sur des films de PET et de PTFE et d'un nouveau médiateur anti-apoptotique, la chondroïtine sulfate (CS) pour améliorer la guérison vasculaire autour des EC. Des essais cellulaires ont été effectués *in vitro*. Les résultats prometteurs obtenus suggèrent que le PPE:N et/ou la CS pourraient aider dans l'initiation de la réparation vasculaire autour des EC et ainsi réduire le risque de complications lors de l'utilisation futur de ce traitement minimalement invasif.

Mots-clés: Endoprothèse couverte, anévrisme de l'aorte abdominale, explants, guérison vasculaire, dégradation de l'implant, néointima, polymérisation par plasma, chondroïtine sulfate, adhésion cellulaire, apoptose.

ABSTRACT

In industrialized countries where abdominal aortic aneurysm (AAA) prevalence and surgical risk are increasing in ageing populations, the endovascular aneurysm repair with stent-graft (SG) prosthesis offers a promising, less invasive alternative to open surgery. The widespread use of this approach is, however, limited by several complications.

This project is divided in two distinct parts. First, we analysed explanted SG and their surrounding tissues to gain a better understanding of the mechanisms of failure. We found that implant degradation is still a problem and we found a lack of healing, even after several years of implantation. Factors explaining the lack of tissue organization around SG are discussed.

These results led to the second part of this work which consisted in exploring the potential of a new nitrogen-rich plasma-polymerised biomaterial, designated PPE:N (on PET et PTFE films) and a newly identified anti-apoptotic mediator i.e. chondroitin sulphate (CS), to foster vascular healing. Adhesion, growth, migration, resistance to apoptosis and myofibroblast differentiation, were assessed *in vitro* on control and modified surfaces in presence or not of CS. Our promising results suggest that PPE:N-coating and/or CS could help initiate vascular repair around SGs and decrease the risk of complications of this treatment in the future

Keywords: stent-graft, abdominal aortic aneurysm, explants, vascular healing, implant degradation, neointima, plasma polymerisation, chondroitin sulphate, cell adhesion, apoptosis

TABLES DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT.....	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	XII
REMERCIEMENTS.....	XIV
 CHAPITRE I - INTRODUCTION	 1
 CHAPITRE II - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ET OBJECTIFS	 4
II-1- L'aorte abdominale, une artère élastique.....	4
II -1-1- L'intima	5
II -1-2- La média	5
II -1-3- L'adventice	5
II -1-4- La matrice extracellulaire (MEC).....	6
II-2- Définition, Incidence et physiopathologie des AAA	8
II -2-1- Définition et diagnostique.....	8
II-2-2- Incidence.....	9
II-2-3- Facteurs de risque	9
II-2-4- Mécanismes de formation des AAA.....	10
II-2-4-1- Athérosclérose et inflammation	10
II-2-4-2- La dégradation de la matrice	12
II-2-4-3- Caractéristiques cellulaires des AAA.....	13
II-2-4-4- La biomécanique des AAA	14
II-2-4-5- Le thrombus intra-luminal	15
II-3- Traitements des AAA et complications.....	15
II-3-1- Chirurgie : traitement « gold standard »	16

II-3-2- Chirurgie endovasculaire par la pose d'une EC.....	17
II-3-2-1- Historiques et EC actuelles	17
II-3-2-2- Complications	21
II-3-3- Les mécanismes d'échecs des EC.....	25
II-4- Mécanismes d'incorporation des EC	27
II-4-1- La guérison vasculaire en général.....	27
II-4-2- Guérison autour des EC.....	28
II-4-3- Les médiateurs connus de la guérison vasculaire	30
II-4-4- La chondroïtine sulfate (CS), un nouveau médiateur de la réparation vasculaire récemment découvert	31
II-5- Modification de surface des biomatériaux.....	33
II-5 -1- Biomateriaux actuels et leurs propriétés.....	33
II-5-2- Modification de surface par plasma.....	34
II-5-3- Le PPE :N... un revêtement novateur	35
II-6- Objectifs.....	36
 CHAPITRE III - PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES.....	38
III-1- Analyse d'EC explantées.....	38
III -1-1- Données cliniques	38
III -1-2- Test non- destructifs	38
III-1-2-1- Analyse macroscopique	38
III-1-2-2- Techniques d'imagerie.....	39
III-1-3- Tests destructifs.....	40
III-1-3-1- Histologie	40
III-1-3-2- Analyse de surface.....	42
III-2- Vers une EC bioactive : modification de la surface des biomatériaux.....	48
III-2-1- Méthode de déposition du PPE : N	48
III-2-2 Caractérisation du PPE :N	49
III-2-2-1- Spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS « X-ray photoelectron spectroscopy »)	49
III-2-2-2- Angle de contact	50
III- 3- Stimulation des mécanismes cellulaires de la formation néointimale in vitro	53
III-3-1- Essai d'adhésion.....	53

III-3-2- Test de migration.....	54
III-3-3- Essai d'apoptose.....	55
III-3-4- Test de croissance cellulaire.....	57
III-3-5- Test de différenciation des fibroblastes.....	58
 CHAPITRE IV - RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.....	 60
IV-1- Organisation des résultats	60
IV-2- Dégradation de l'implant et guérison inadéquate après une réparation endovasculaire des anévrismes de l'aorte abdominale : analyse d'endoprothèses couvertes explantées.....	62
IV -2-1- Avant-propos: Contribution des auteurs (Article I)	63
IV -2-2- Manuscrit de l'article I.....	64
IV-3- Un revêtement riche en azote utilisé pour favoriser la guérison autour des endoprothèses couvertes après la réparation endovasculaire d'un anévrisme	86
IV -3-1- Avant-propos: Contribution des auteurs (Article II).....	87
IV -3-2- Manuscrit de l'article II.....	88
 CHAPITRE V – DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	 115
V -1- Complication et échecs reliés à la dégradation de l'implant	115
V -2 La guérison autour de l'EC est-elle possible ?.....	117
V -2-1 Guérison tissulaire déficiente observée	118
V -2-2 Réaction inflammatoire persistante	120
V -2-3 Cas de guérison.....	122
V -2-4 Les facteurs qui peuvent expliquer la mauvaise guérison.	123
V-2-4-1 La physiopathologie des AAA	123
V-2-4-2 Propriétés de surface des biomatériaux	124
V -3 Quelle est la cause des cas d'échec ?	125
V-4- Vers une EC bioactive.....	127
V -4-1 Le PPE:N comme revêtement de la surface.....	128
V -4-2 La CS comme médiateur	130
V -4-3 Les limites de notre approche et travaux futurs.....	131
V-4-3-1 Biocompatibilité du PPE:N	134
V-4-3-2 Le potentiel du PPE:N pour la guérison vasculaire.....	134
V -5- Conclusion- Un avenir prometteur pour les EC	135

BIBLIOGRAPHIES.....	137
---------------------	-----

ANNEXES.....	A
--------------	---

Annexe 1- Formulaire d'information et de consentement (1)	A1.1
Annexe 2- Formulaire d'information et de consentement (2)	A2.1
Annexe 3- Protocole pour l'adhésion.....	A3.1
Annexe 4- Protocole pour la migration.....	A4.1
Annexe 5- Protocole pour l'apoptose.....	A5.1
Annexe 6- Protocole pour la croissance cellulaire.....	A6.1
Annexe 7- Protocole pour La différenciation cellulaire.....	A7.1
Annexe 8- Accord des coauteurs et permission de l'éditeur (Article I)	A8.1
Annexe 9- Accord des coauteurs et permission de l'éditeur (Article II).....	A9.1

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Principaux modèles d'EC commercialisées pour les AAA	20
Tableau II-1: Propriétés de différents liquides utilisés pour les mesures d'angle de contact.....	51
Tableau III: Clinical Data	69
Tableau IV: Stent-Graft Alterations	72
Tableau V: Thickness and Nickel/Titanium (Ni/Ti) Superficial Ratio of the Oxide Layer Covering Nitinol Struts of Each Explant and Control (determined by Auger electron spectroscopy)...	74
Tableau VI: Relative elemental compositions	98

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Endoprothèse couverte dans un anévrisme de l'aorte abdominale	2
Figure 2 : Structure de l'aorte	4
Figure 3 : Représentation schématique de la structure de la matrice extracellulaire de l'aorte.....	7
Figure 4 : Anévrisme de l'aorte abdominale.....	9
Figure 5 : Processus de formation d'une plaque d'athérosclérose	11
Figure 6 : Chirurgie standard avec la mise en place d'une prothèse vasculaire	16
Figure 7 : Structure d'une endoprothèse couverte.....	18
Figure 8 : Schéma et explication des différents types d' endofuites sanguines.....	26
Figure 9 : Structure du perlécan.....	31
Figure 10 : Structure de la chondroïtine sulfate.....	32
Figure 11: Structure du PET et du ePTFE.....	33
Figure 12: Hétérogénéité du thrombus	39
Figure 13: Système Exakt	41
Figure 14: Mécanisme de fonctionnement de l'émission des électrons d'Auger	44
Figure 15: JAMP-30	45
Figure 16: Calculs de la couche d'oxyde de nos échantillons	47
Figure 17: Système de déposition par plasma atmosphérique	49
Figure 18: Représentation de l'angle de contact d'une goutte d'eau déposée sur une surface.....	51
Figure 19: Effets de la stérilisation sur le PET vierge	52
Figure 20: Schéma de la méthode utilisée pour effectuer les tests de migration.....	55
Figure 21: SG design.....	68

Figure 22: Fabric tearing.....	72
Figure 23: Talent broken metallic struts	73
Figure 24: Tissue encapsulating the SG in conversion case	76
Figure 25: Tissue encapsulating the SG in autopsy case.....	77
Figure 26: Beginning of neointimal organisation.....	78
Figure 27: Values of water contact angle for control and PPE:N coated surfaces	99
Figure 28: VSMC adhesion at 1 hour	100
Figure 29: Adhesion kinetics of VSMC and fibroblast.....	101
Figure 30: Cell growth assay	102
Figure 31: Result of resistance to apoptosis in VSMC	103
Figure 32: Migration of VSMC	104
Figure 33: Immunoblotting	105
Figure 34: Rappel des différents termes dans la guérison tissulaire entourant les EC.....	118

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

α -SMA	« Alpha- smooth muscle actin »
AAA	Anévrisme de l'aorte abdominale
AES	Spectroscopie Auger (« Auger Electron Spectroscopy, AES »)
C ₂ H ₄	Éthylène
CC	Cylindre de clonage (« cloning cylinder »)
CEV	cellule endothéliale vasculaire
CHUM	Centre hospitalier de l'Université de Montréal
CMLV	Cellule musculaire lisse vasculaire (« vascular smooth muscle cell, VSMC »)
CS	Chondroïtine sulfate
EC	Endoprothèse couverte (« stent-graft, SG »)
ePTFE	Polytétrafluoroéthylène expansé
FDA	Foods and drugs administration
GAG	Glycosaminoglycane
H&E	Coloration à l'hématoxyline et l'éosine
HO	Hoechst 33342
HOPI	Technique à fluorescence utilisée pour les essais apoptose
HSPG	Héparane sulfate protéoglycane
MEB	Microscopie électronique à balayage
MEC	Matrice extracellulaire
MSC	Cellules souches mésenchymateuses (« Mesenchymal Stem Cells, MSC »)
MMP	Matrix-métalloprotéinase

N ₂	Azote
NH ₂	Amine primaire
Ni	Nickel
NiTi	Nitinol
OE	Oxyde d'éthylène
PAS	« Periodic acid schiff »
PBS	« Phosphate buffer saline »
PCP	Plaque de culture de polystyrène
PET	Polyéthylène-téréphthalate ou polyester
PG	Protéoglycannes
PI	Iodure de propidium
PMN	Polymorphonucléaires
PPE :N	« N-doped plasma-polymerised ethylene »
PMMA	Poly-méthyl-méthacrylate
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
SS	Sans sérum
UV	Ultraviolet
Ti	Titane
TIL	Thrombus intra-luminal
TBS	« Tris buffered saline »
TTBS	« Tween TBS »
XPS	Spectroscopie photoélectronique à rayons X (« X-ray photoelectron spectroscopy, XPS »)

REMERCIEMENTS

Je voudrais en premier lieu souligner le travail exceptionnel de Sophie Lerouge et la remercier pour avoir dirigé mes travaux de maîtrise au sein de son nouveau laboratoire de biomatériaux endovasculaires (LBeV). Sa rigueur et ses compétences scientifiques m'ont permis de réaliser ce projet. Ses conseils éclairés m'ont permis de développer mon sens critique et d'articuler mon travail. Elle m'a permis de me surpasser et d'accomplir un travail remarquable.

Je tiens aussi à remercier ma codirectrice de maîtrise, le Dr. Marie-Josée Hébert. Ses nombreux conseils et son dynamisme ont grandement contribué à ma réussite. Je la remercie également pour la confiance qu'elle m'a accordée et son accueil dans son laboratoire, parmi ses étudiants.

La première partie de mon projet de maîtrise sur les SG explantés n'aurait pas été possible sans la collaboration de nombreuses personnes dont le Dr. Gilles Soulez, radiologiste au CHUM, que je tiens à remercier. Je voudrais aussi remercier le Dr. Robert Guidoin pour son implication, sa collaboration précieuse et ses contacts avec les médecins étrangers qui nous ont fourni des spécimens. Finalement, je voudrais remercier tous les chirurgiens et médecins qui ont été impliqués dans ce projet, tout particulièrement Dr. Louis Gaboury pour son temps et son expertise.

J'adresse également mes remerciements aux membres de mon jury, le Dr. Robert Aimé Leblanc et le Dr. Gregory De Crescenzo, qui ont accepté d'évaluer mon travail. La qualité de leurs commentaires et leurs corrections pertinentes a enrichi mon travail.

J'aimerais remercier, pour leur soutien financier, l'Institut de génie biomédical, ainsi que la Faculté des études supérieures pour m'avoir accordé deux bourses durant le déroulement de ce projet.

Au cours de ma maîtrise, j'ai côtoyé plusieurs personnes qui m'ont aidée dans mon cheminement. Un merci spécial à Marc-André Raymond, Patrick Laplante, Isabelle Sirois et Normand Vigneault pour leur soutien technique et leurs réponses à mes nombreuses questions (il y en a eu beaucoup....je sais !). Je souhaiterais aussi remercier Cindy Charbonneau et Marie-Christine Bonneviot pour leur aide surtout à la toute fin. Votre aide m'a été précieuse et votre soutien très apprécié ! J'aimerais remercier Pierre-Luc Girard-Lauriault pour sa précieuse collaboration dans la modification des surfaces par plasma atmosphérique. Un autre merci à Éric Duchesne du CM² pour son aide avec l'Auger. Je tiens également à remercier Stéfania Polizu pour ses qualités humaines et son aide avec le MEB. Merci de m'avoir fait découvrir et aimer la recherche !

Au sein du centre de recherche du CHUM, j'ai cohabité une grande partie de ma maîtrise avec les étudiants du laboratoire de recherche en imagerie et orthopédie (LIO). J'ai aussi eu le plaisir de partager plusieurs très bons repas internationaux avec les étudiants du laboratoire de biorhéologie et d'ultrasonographie médicale (LBUM). Donc, je voudrais dire un gros merci aux étudiants du LIO, du LBUM et aussi du laboratoire du Dr. Hébert pour leur bonne humeur, leur gentillesse et leur accueil. Un gros merci également à Dianne Caza et Brigitte Dubreuil pour leur dévouement.

Finalement, indépendamment de toutes considérations scientifiques, j'aimerais remercier du fond de mon cœur mon entourage qui m'a supporté durant plus de deux ans. Sans le soutien et l'amitié de (dans le désordre) Jean-Sébastien St-Amour, Louise Lambert, Alain Major, Katou Major, Jacinthe Poirier, Maxime Lamy, Xavier Kalibbala et Marguerite Deschamps, je ne crois pas que j'y serais arrivée. Je vous dois mon épanouissement. Merci d'avoir compris que vous étiez importants, même si j'ai eu peu de temps à vous accorder. Merci de m'avoir toujours encouragée à me dépasser. Merci de m'avoir remonté le moral, lorsque je croyais que je n'y arriverais pas. Tout simplement...merci d'être là. Tout spécialement, un merci gigantesque à mon copain Jean-Sébastien qui a fait preuve de beaucoup de patience et qui m'a facilité la vie (lavage, vaisselle,...le quotidien quoi !) pour que je puisse accomplir cette belle réalisation dont je suis très fière. Merci à toutes et à tous de m'avoir entourée avec autant d'amour ...



CHAPITRE I - INTRODUCTION

L'incidence des maladies cardiovasculaires est un problème majeur dans les pays industrialisés. Les **maladies cardiovasculaires coûtent plus de 18 milliards de dollars par année** aux Canadiens et Canadiennes. Le vieillissement de la population est une autre réalité à laquelle ces pays doivent faire face. C'est dans ce contexte que les **thérapies minimalement invasives** ont vu le jour, dont les endoprothèses couvertes (EC ou « stent-graft ») pour le traitement des anévrismes de l'aorte abdominale (AAA).

Les AAA sont une dilatation de l'aorte dans son segment abdominal de 50% par rapport à son diamètre normal et **leur rupture provoque une hémorragie massive qui cause la mort dans 60-70% des cas**. Les EC sont composées d'une structure métallique à laquelle est attachée, par des sutures, un recouvrement polymérique (ou « graft »). Elle est insérée à l'aide d'un cathéter par l'artère fémorale et sera par la suite déployée à l'intérieur de l'anévrisme (Fig. 1) pour l'exclure de la circulation sanguine. Ce traitement minimalement invasif comporte plusieurs avantages, dont la réduction de la perte de sang durant la chirurgie, de la nécessité de transfusions, du temps d'hospitalisation, de la durée de séjour aux soins intensifs, de la convalescence du patient et de la **mortalité/morbidité à court terme** comparativement à la chirurgie ouverte standard.

Malheureusement, les EC ne représentent que 10-15% des réparations des AAA au Canada. Leur efficacité est limitée par les fréquentes complications rencontrées. La migration de la prothèse,

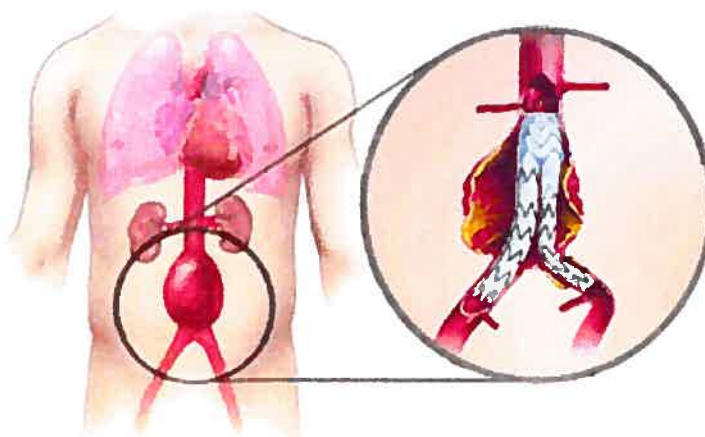


Figure 1 : Endoprothèse couverte dans un anévrisme de l'aorte abdominale

(<http://www.sirweb.org/patPub/abdominalAorticTreatments.shtml>)

les fuites sanguines qui continuent à alimenter l'anévrisme (ou « endoleaks ») et la dégradation des biomatériaux entraînent une reperfusion du sac anévrisimal, et le risque ultime est la rupture de l'anévrisme. **Les mécanismes responsables de ces échecs sont complexes et encore mal compris.** Notre but est d'acquérir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les cas d'échec et de définir des stratégies permettant d'améliorer les implants actuels, pour diminuer les risques d'échec et augmenter l'utilisation de ce traitement minimalement invasif des AAA.

Ce projet se divise en deux parties distinctes. Premièrement, l'analyse d'EC explantées chez des patients nous fournit **des renseignements uniques sur l'adaptabilité *in vivo*** de ses endoprothèses, soit leurs altérations *in vivo*, leur effet sur l'environnement biologique et leur incorporation à celui-ci. Nous avons analysé les altérations des biomatériaux qui composent l'implant et leurs réactions biologiques à l'interface (tissu/ EC) et dans le sac anévrisimal. Cette approche, soit l'analyse simultanée des tissus et des implants, n'a pas encore été réalisée sur les EC.

Lors des travaux sur les EC explantées, nous avons constaté une absence de guérison autour des EC. Cette faible incorporation des EC aux tissus environnants pourrait être une des causes menant à l'échec des EC. Nous avons voulu trouver des stratégies qui favoriseraient la guérison, soit la formation d'une néointima organisée autour des EC. Le choix de ces stratégies a été basé sur deux facteurs importants qui limitent cette guérison. Premièrement, le contexte pro-apoptotique et de déplétion des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) au niveau de l'anévrisme. Ensuite, les propriétés de surface du recouvrement polymérique en polyester (PET) ou polytétrafluéthylène (PTFE) qui ne favorisent pas l'adhésion des cellules. La deuxième partie de ce projet consiste donc à tester, *in vitro*, l'effet d'un nouveau revêtement de surface et d'un médiateur anti-apoptotique récemment découvert, la chondroïtine sulfate (CS), pour stimuler la formation d'une néointima organisée autour des EC et ainsi réduire les complications associées à leur utilisation et leur permettre une utilisation à plus grande échelle.

En premier lieu, une revue de la littérature est présentée au chapitre II. Ensuite, les objectifs seront clairement définis au chapitre III et les procédures expérimentales seront détaillées dans le chapitre IV. Nous avons choisi la présentation « par article » pour la rédaction de ce mémoire. Deux articles ont été rédigés, soit l'article I qui traite de l'analyse des EC explantées (actuellement publié dans Journal of Endovascular Therapy) et l'article II qui expose les essais de la stimulation de la formation néointimale *in vitro* (accepté pour publication dans Biomaterials). Ces articles constituent le corps de cet ouvrage. Ils sont présentés dans le chapitre V. Enfin, une discussion générale concluant sur l'avenir prometteur des EC est élaborée dans le chapitre VI.

Bonne lecture !

CHAPITRE II - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ET OBJECTIFS

II-1- L'aorte abdominale, une artère élastique

Avant de parler de la physiopathologie des anévrysmes de l'aorte abdominale (AAA), il est essentiel de bien comprendre la structure et les composantes de l'aorte elle-même. L'aorte, est une artère de gros diamètre (2 à 2,5 cm) à la paroi épaisse et très élastique naissant du cœur, qui descend vers l'ombilic, où elle se divise en deux artères iliaques primitives ou communes [1]. C'est dans le segment abdominal de l'aorte, généralement sous la jonction des artères rénales que surviennent les AAA [2, 3]. La paroi de l'aorte est composée de trois couches ou tuniques, soit (de la lumière vers la paroi extérieure) : l'intima, la média et l'adventice (Fig. 2).

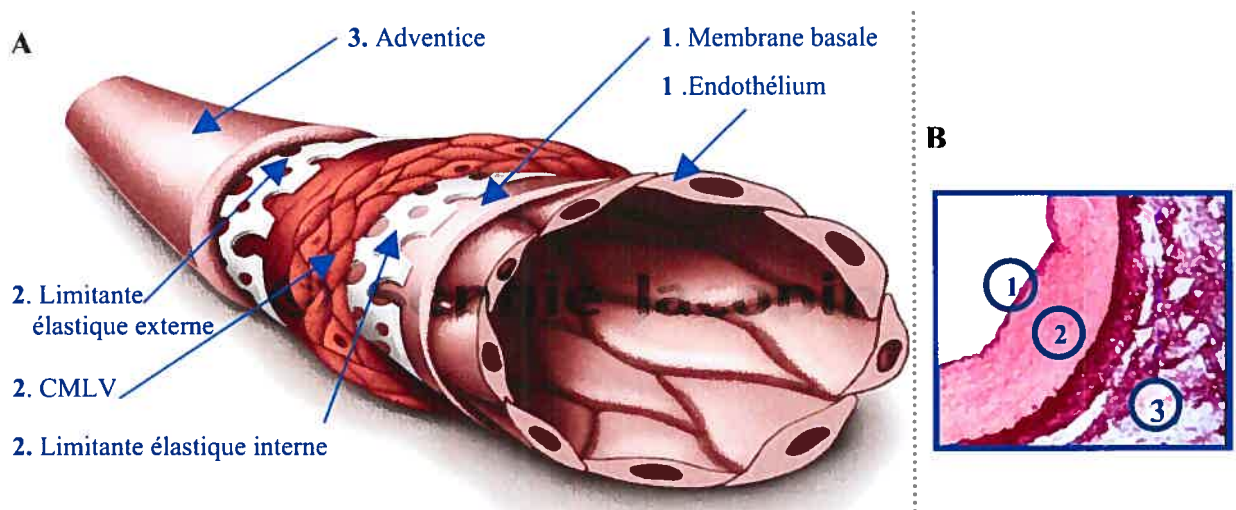


Figure 2 : Structure de l'aorte

A. L'artère est composée de 3 structures soit : 1. Intima du vaisseau 2. Média du vaisseau 3. L'adventice du vaisseau.

B. Coupe histologique d'une aorte saine

(<http://snl.chcz.tiscali.fr/cardio>)

II -1-1- L'intima

L'intima est composée d'une monocouche de cellules endothéliales vasculaires (CEV), qui constitue l'endothélium, et d'une membrane basale [1, 3, 4]. Les CEV assument plusieurs fonctions et participent activement à l'homéostasie, **principalement en inhibant la thrombose** [3, 4]. Les CEV permettent le passage, à leur jonction, de différents types cellulaires provenant de la circulation sanguine (leucocytes, macrophages,...) en exprimant des facteurs d'adhésion sous l'influence de certains médiateurs [3, 4].

II -1-2- La média

La média est la couche la plus épaisse dans l'aorte. Elle contient les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) qui sont disposées en anneaux. Les CMLV sont séparés par de larges feuillets d'élastine concentriques, qui forme des lamelles élastiques [1, 3, 4]. La média est bordée par deux limitantes élastiques. Les CMLV sont responsables du tonus des vaisseaux et elles sont influencées par les médiateurs libérés par l'endothélium et/ou par les terminaisons nerveuses de l'adventice [1-5].

II -1-3- L'adventice

L'adventice est composé majoritairement de collagène en plus de contenir les fibroblastes. Les fibroblastes sont à la base de ce tissu conjonctif lâche. Dans les vaisseaux en état normal, ils sont quiescents et sécrètent de la matrice extracellulaire (MEC), notamment le collagène [3,4]. L'adventice est parcouru par des terminaisons nerveuses et des minuscules vaisseaux (vasa vasorum) qui servent à alimenter le tissu externe des gros vaisseaux, permettant l'apport des facteurs de croissance et de l'oxygène.

II -1-4- La matrice extracellulaire (MEC)

La matrice extracellulaire (MEC) désigne l'ensemble de macromolécules extracellulaires du tissu conjonctif. Selon sa composition moléculaire, la MEC joue différents rôles physiologiques, dont le soutien structural, l'adhérence, le mouvement et la régulation de la cellule [5]. Les différentes composantes de la MEC sont dégradées par différentes protéinases (en particulier, les matrix-métalloprotéinases (MMP)). Le renouvellement de la MEC est déterminant dans la croissance, le développement ou la réparation des tissus, mais intervient aussi dans de nombreux processus pathologiques [5, 6]. La MEC est constituée en grande partie de protéines pures, de glycoprotéines ainsi que de glycosaminoglycannes (GAG) (Fig.3).

La principale protéine pure de la MEC dans l'aorte est l'élastine [1, 3 ,4]. L'élastine est une substance très élastique de basse rigidité, qui supporte la charge en condition physiologique et peut être étirée jusqu'à 60% sans perdre de son élasticité. Elle permet à l'aorte de supporter et de compenser de grandes fluctuations de pression [1, 3, 4].

Pour les glycoprotéines, il y a en a trois principales soit : le collagène, la fibronectine et la laminine. **Le collagène est une fibre épaisse et très rigide qui préserve la structure du vaisseau**, comme une armature. Il est inextensible et résiste bien à la traction. Le collagène est indispensable aux processus de cicatrisation. Il existe plus de 20 types de collagènes selon sa localisation. Dans l'aorte, on retrouve le collagène IV, VII et VIII au niveau de la membrane basale et l'endothélium, tandis que le reste de la paroi contient principalement du collagène I, III et V [5-7]. **La Fibronectine et la Laminine** sont des glycoprotéines de liaisons entre les éléments de la MEC et les cellules [5, 6].

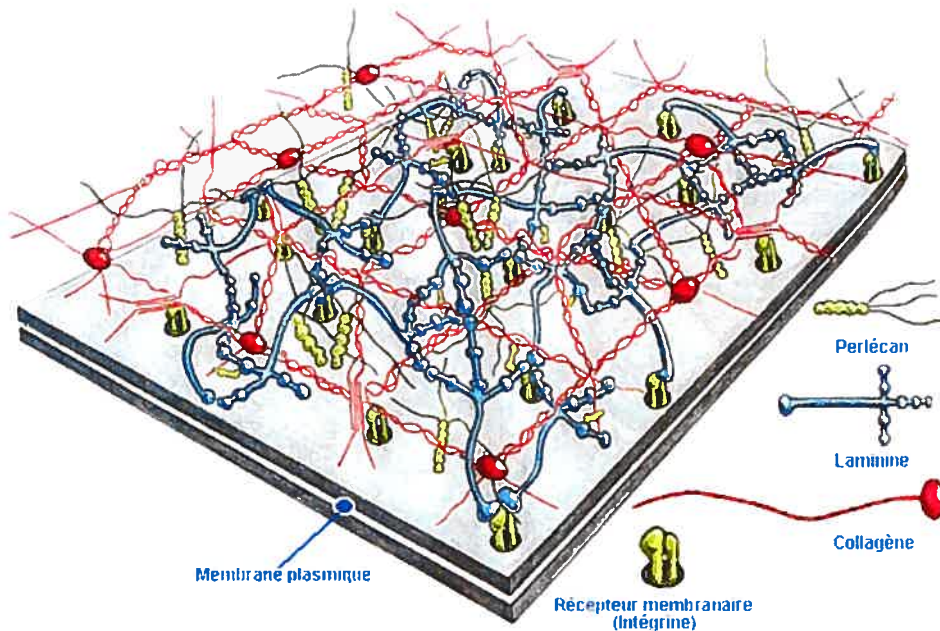


Figure 3 : Représentation schématique de la structure de la matrice extracellulaire de l'aorte

A. Les laminines relient la membrane cellulaire aux autres molécules de la MEC

(<http://www.upci.ca/pathclub>)

Finalement, les GAG sont de longs polysaccharides non ramifiés constitués par la répétition et la polymérisation d'unité de disaccharides [6]. Ils forment une importante composante des tissus conjonctifs. **Il existe 7 GAG, soit :**

- la chondroïtine sulfate (qui est la plus abondante [5])
- l'héparane sulfate,
- le sulfate dermatant,
- l'héparine
- le sulfate keratan type 1 et type 2,
- l'acide hyaluronique

Dans la MEC, les GAG sont souvent associés à des protéines et forment des protéoglycannes (PG). Dans l'appareil vasculaire, les principaux PG sont de la famille des héparanes sulfates protéoglycannes (HSPG). **Le principal HSPG dans la paroi de l'aorte est le perlécane [5, 8].** Les GAG et protéoglycannes forment un gel hydraté dans lequel baignent les cellules [5, 6].

II-2- Définition, Incidence et physiopathologie des AAA

II -2-1- Définition et diagnostique

Il est important de bien comprendre le contexte pathologique dans lequel l'EC est insérée. Un AAA (Fig. 4) est une dilatation, permanente et localisée dans le segment abdominal de l'aorte, de 50% par rapport au diamètre du segment aortique sain en amont [9, 10]. Par convention, on considère anévrismale une aorte dont le diamètre est de plus de 3 cm [11]. Les AAA sont, dans la majorité des cas, asymptomatiques et sont détectés par des examens radiologiques de routine, hors d'un contexte d'urgence. Une douleur importante au niveau de l'abdomen et une masse pulsative détectée par le médecin sont les principales manifestations cliniques qui indiquent la présence d'un AAA. Si l'anévrisme est plus petit que 55 mm, un suivi radiologique est effectué pour suivre l'évolution de la pathologie et s'assurer de prévenir la rupture [12, 13]. Les AAA représentent un danger à partir d'un certain diamètre, car la paroi artérielle devient de plus en plus fragile. Les anévrismes s'élargissent à un taux de 4-5 mm par année. Le risque de rupture augmente avec la taille de l'anévrisme, soit 0% à 4cm ou moins, 1% de 4 à 4.9cm, 11% de 5 à 6,4 cm et de 26% pour les AAA de plus de 6,4 cm [14, 15]. La rupture de l'anévrisme est la conséquence ultime et elle entraîne une hémorragie importante qui est fatale dans plus de 60 à 85% des cas. [10, 16, 17] et dans la moitié des cas, le patient décède avant d'arriver à l'hôpital [18]. En dépit des progrès réalisés lors des 40 dernières années, la mortalité à la suite de la rupture d'un AAA a diminué légèrement, mais demeure très élevée [19,20], ce qui indique que la prévention de la rupture et le dépistage des AAA sont les meilleures solutions pour la survie des patients [21, 22].

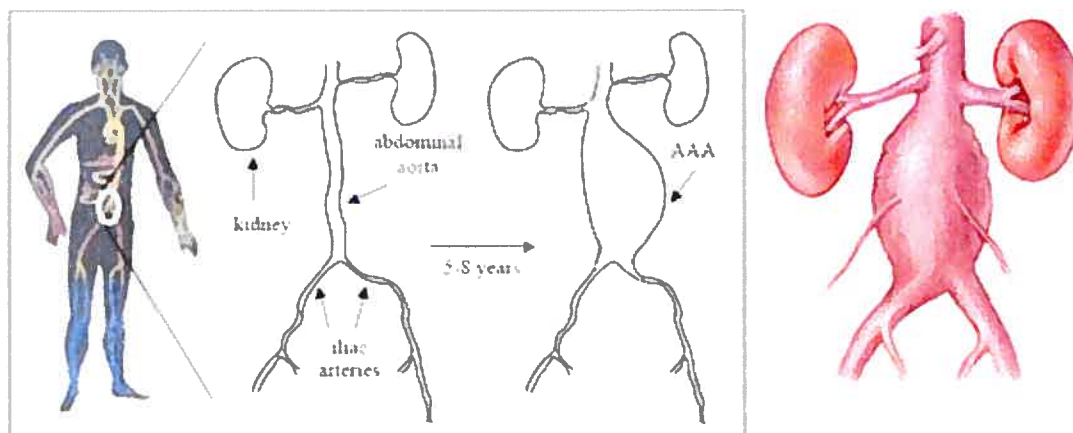


Figure II-4 : Anévrisme de l'aorte abdominale

A. Anévrisme de l'aorte abdominale. L'anévrisme se forme sous les artères rénales et s'étend jusqu'aux artères iliaques.

(<http://www.sirwebc.org/patPub/abdominalAorticTreatments.shtml>)

II-2-2- Incidence

Les AAA sont un problème de santé majeur qui touche de 5% à 8.8% de la population avec une augmentation importante de l'incidence dans les trois dernières décennies [23-27]. Ils sont la 14^{ème} cause de mortalité en Amérique du Nord [28] et la 10^e chez les hommes de race blanche âgés entre 65 et 74 ans aux États-unis [29]. Environ 200,000 nouveaux cas d'AAA sont diagnostiqués chaque année. Il est donc très important de comprendre et de traiter efficacement cette pathologie face à une population de plus en plus âgée

II-2-3- Facteurs de risque

Il existe plusieurs facteurs prédisposant à cette pathologie : l'hypertension, le tabagisme, l'hypercholestérolémie, le diabète, la génétique familiale et l'obstruction pulmonaire chronique. Les hommes sont largement plus susceptibles que les femmes (6:1) et le risque augmente avec l'âge [10, 30-34].

II-2-4- Mécanismes de formation des AAA

Les mécanismes qui interviennent dans la formation des AAA sont encore mal élucidés. Une très petite partie (<5%) des AAA est dû à un traumatisme, à une infection aïgue (brucellosis salmonellosis) ou chronique (tuberculose), à une maladie inflammatoire (syndrome de Behçet et Takayasu) [35, 36] ou à une pathologie des tissus conjonctifs (syndrome de Marfan et Ehlers-Danlos type IV) [37], mais nous ne les aborderons pas dans cet ouvrage. Plusieurs facteurs sont impliqués dans l'initiation et/ou le développement des AAA. L'athérosclérose, la dégradation de la matrice, certains événements cellulaires, la biomécanique et le thrombus intra-luminal (TIL) ont un rôle dans les étapes du développement des AAA, mais la proportion de chacun reste à déterminer [30,38]. Il existe aussi un facteur génétique dans la formation des AAA [29, 39-41]. Par contre, nous n'aborderons pas cette problématique complexe, puisqu'elle excède le cadre de cette étude.

II-2-4-1- Athérosclérose et inflammation

Plus de 90% des AAA sont sous les artères rénales et associés avec de l'athérosclérose [37, 42]. L'athérosclérose est un facteur central dans les AAA [2, 10]. L'organisation mondiale de la santé définissait l'athérosclérose en 1958, comme une variation du remaniement de l'intima des artères de gros et de moyens calibres, consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôt de calcaire, le tout s'accompagnant de modification de la média qui favorise le développement des AAA [43]. Cette définition indique bien la complexité de l'athérosclérose et son implication dans les AAA. La formation d'une plaque athéromateuse est décrite à la figure 5.

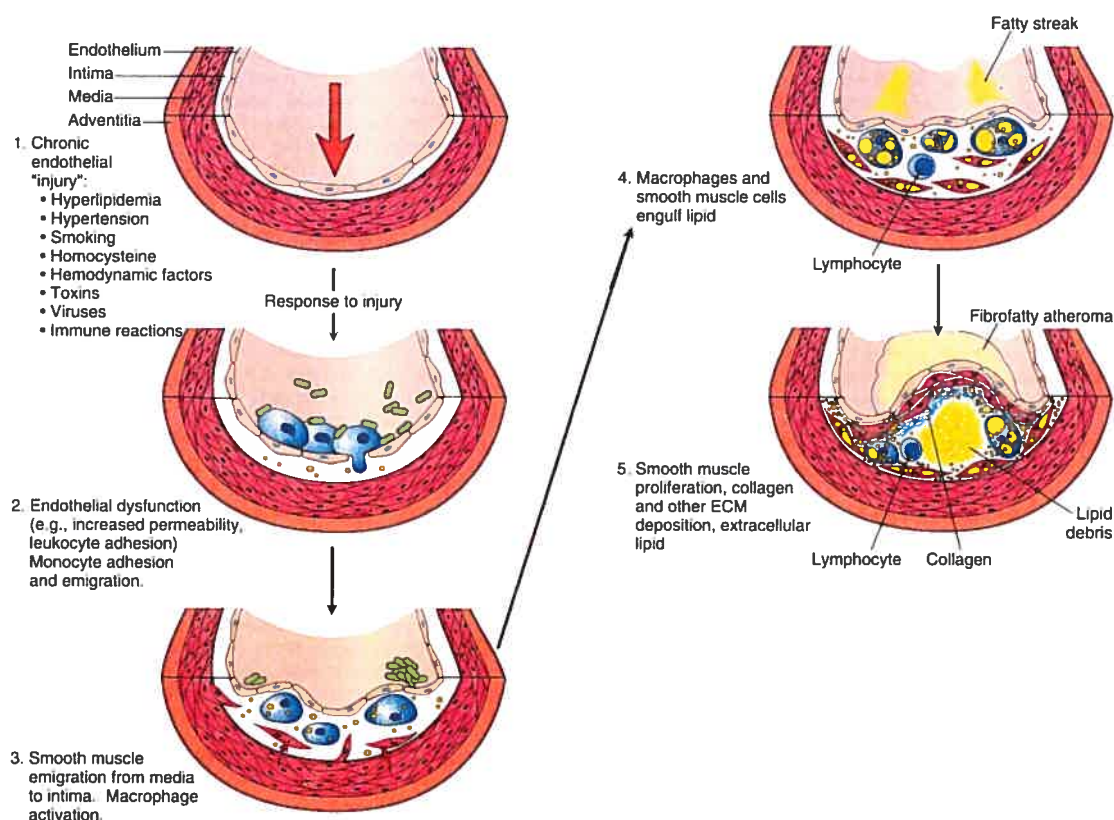


Figure 5 : Processus de formation d'une plaque d'athérosclérose [2]

1. Vaisseau normal 2. Atteinte endothéliale avec une adhésion de plaquettes et de monocytes au site d'insulte 3. Migration des monocytes de la lumière du vaisseau et migration des CMLV à partir de la média jusqu'à l'intima. 4. Prolifération des CMLV dans l'intima 5. Plaque athéromateuse bien développée.

Tous les patients qui ont des plaques d'athérosclérose ne développent pas des AAA, ce qui signifie que l'athérosclérose joue un rôle important dans cette pathologie, mais que d'autres facteurs sont nécessaires pour le développement des AAA. Pour que l'athérosclérose évolue vers un AAA, il faut d'autres facteurs notamment l'inflammation [44-46]. L'atrophie de la média dans une plaque d'athérosclérose serait la cause des AAA, selon certains auteurs [2, 10, 37]. Un autre modèle veut que l'inflammation aggrave les AAA athérosclérotiques [47]. Il y a en effet, une inflammation chronique dans la média et l'adventice caractérisée par un infiltrat de cellules

inflammatoires, incluant des lymphocytes B et T, des polymorphonucléaires (PMN) et des macrophages. Ces cellules répondraient à des lipides oxydés qui sont dans la paroi et qui proviennent de l'intima. [37]. La cause exacte de la réaction inflammatoire dans les AAA n'est pas encore comprise, bien qu'il y ait plusieurs théories. La présence d'immunoglobuline G dans la paroi fait supposer à certains auteurs que les AAA sont une forme de maladie auto-immune [44, 48, 49]. D'autres auteurs favorisent l'hypothèse d'un agent infectieux comme la *Chlamydia pneumoniae* [50]. Des fragments solubles qui proviennent de la dégradation de la MEC, incluant l'élastine, la laminine et la fibronectine, pourraient aussi servir d'agent chimottractant dans les AAA [51]. Plusieurs autres molécules pourraient aussi être impliquées pour attirer les cellules inflammatoires comme l'interleukine-8, le chémoattractant protéine-1 (MCP-1) et/ou les RANTES (regulated on activation normal T-cell expressed and secreted) [52, 53].

II-2-4-2- La dégradation de la matrice

La progression de la dilation des AAA est reliée à la destruction de la MEC de la paroi aortique, particulièrement l'élastine et le collagène. Les AAA reflètent une altération dans la balance entre la synthèse et la dégradation de la MEC. Des études biochimiques démontrent que la diminution du contenu d'élastine apparaît très tôt dans la formation d'un anévrisme artériel et continue dans le temps, jusqu'à la rupture de l'anévrisme [38, 54, 55]. Au tout début de la pathologie, il y a une augmentation de la production de collagène (épaississement de l'adventice) qui rend l'aorte de plus en plus rigide. Dans un stade plus avancé, le contenu en collagène est diminué. Certaines études soutiennent que la perte des lamelles élastiques est une étape critique à la formation d'anévrisme et que la perte de collagène joue un rôle important dans l'élargissement et la rupture de l'anévrisme [28, 56].

Les AAA sont caractérisés par un infiltrat inflammatoire qui contient des macrophages et des lymphocytes T qui sécrètent des cytokines et qui augmentent la production d'enzymes, responsables de la destruction de la MEC. [10, 47, 57] Le plus grand groupe d'enzymes impliqué sont les matrix metalloprotéinases (MMP) qui sont des enzymes dépendant du Zn^{2+} et Ca^{2+} . Il existe au moins 12 protéines différentes qui ont été séquencées [58]. Chacune a un substrat de préférence. La MMP-3 (stromelysin 1) et la MMP-12 (matelloelastase) dégradent l'élastine. Dans le contexte pathologique des AAA, un mélange de MMP est requise pour dégrader plus de composantes de la MEC, comme le collagène de type I (MMP-1 ou Interstitiel collagénase), le collagène de type IV (MMP-9 ou gélatinase B) et la laminine, les protéoglycannes et la fibronectine (MMP-3 ou stromelysin 1) [59]. La MMP-9 joue un rôle important dans la pathologie [60]. Il a aussi été démontré que les patients qui ont un AAA ont des taux circulants de MMP-9 plus hauts que les personnes saines [61] et que ce taux peut être significativement associé à la taille et au taux d'expansion de l'AAA [62]. La MMP-12, principalement produite par les macrophages, est aussi impliquée directement dans les AAA [63]. En plus des quantités importantes de MMP, leurs inhibiteurs, les « tissue-inhibitor of matrix metalloproteinases » (TIMPs), sont diminués dans les AAA [59].

II-2-4-3- Caractéristiques cellulaires des AAA

En plus de la dégradation de la matrice, les CMLV sont impliquées dans le développement de la pathologie. Les AAA sont une pathologie qui affecte particulièrement la média. La dégradation de l'élastine amène une perte des lamelles élastiques de la média. Les CMLV qui fabriquent l'élastine et une partie des composantes de la MEC subissent une déplétion dans la média. Leur nombre est réduit jusqu'à 75% de la population initiale. Les CMLV dans la paroi aortique des

AAA meurent par apoptose [10, 47, 62, 64-67]. L'apoptose est un mécanisme génétiquement contrôlé de suicide cellulaire d'une importance cruciale pour la maintenance de l'architecture et de l'homéostasie des tissus [68]. Elle est caractérisée par des changements morphologiques typiques comme le rétrécissement des cellules, la condensation de la chromatine, la formation de corps apoptotique et le détachement de la cellule de la MEC [69]. L'apoptose ne cause pas d'inflammation, comparativement à la nécrose qui est la mort accidentelle d'une cellule. L'apoptose peut être initiée par 2 voies : la voie extrinsèque ou la voie intrinsèque (ou mitochondriale). La voie intrinsèque se caractérise par une augmentation des protéines p53 et Bax et le relargage par la mitochondrie du cytochrome C. Ensuite, un complexe avec la caspase 9 se forme, l'apoptosome, qui activera la caspase 3 qui est l'étape irréversible de l'apoptose puisqu'elle active les caspases effectrices. La voie extrinsèque est activée par la liaison d'un ligand à un récepteur de mort cellulaire (ex. Fas et Fas ligand). L'activation du récepteur active la caspase 8, qui à son tour va activer la caspase 3. La voie extrinsèque peut activer la voie intrinsèque de l'apoptose [69]. La déplétion des CMLV et le phénotype pro-apoptotique des CMLV restantes dans la paroi sont des facteurs déterminants dans la pathologie des AAA et son évolution [63, 70]. Ce fait est d'autant plus important que dans des conditions physiologiques, les CMLV protègent contre l'inflammation et la protéolyse de la MEC [71, 72].

II-2-4-4- La biomécanique des AAA

L'aorte abdominale est soumise à un stress cyclique élevé. En plus, il y a de la turbulence dans cette partie de l'aorte due à la division de celle-ci en 2 artères iliaques. Les conditions particulières de l'aorte abdominale, avec des facteurs qui diminuent la solidité des vaisseaux, peuvent mener à la dilatation, et ultimement à la rupture de l'aorte abdominale [10, 47]. Le rapport collagène/élastine est le déterminant de la mécanique des vaisseaux. L'architecture et

l'épaisseur des parois sont d'autres déterminants mécaniques des vaisseaux. Avec l'âge, de manière naturelle, l'élastine diminue, le collagène augmente et il y a une perte progressive de l'arrangement des fibres élastiques. En plus, les parois des vaisseaux deviennent plus minces par la calcification, les dépôts de collagène et l'athérosclérose. Tous ces facteurs contribuent à une plus grande rigidité de l'aorte et à un flot turbulent, non laminaire, à l'intérieur de l'AAA [73]. La formation d'un anévrisme est un exemple d'échec mécanique d'une structure cylindrique [10].

II-2-4-5- Le thrombus intra-luminal

La présence de thrombus intra-luminal (TIL) dans les AAA est fréquente (>75%) [2, 10]. Le TIL est le thrombus qui se forme sur la paroi de l'AAA. Il découle des lésions ulcérées d'athérosclérose, qui cause la discontinuité de l'endothélium [10]. Le TIL contribue à augmenter le stress à la paroi aortique [23, 74] ou à le diminuer selon les différentes études [75]. La formation de thrombus peut accélérer l'élargissement des anévrismes et mener à la rupture de l'AAA [10, 76]. Le TIL peut, selon certains auteurs, prédire le risque de rupture de l'anévrisme [77]. Il est aussi une source de MMP-9 [78], emmagasine des PNM [64] et contribue à l'activité protéolytique [58, 70]. Les propriétés du TIL sont importantes puisque c'est sur celui-ci que va se former le thrombus dans le sac anévrisimal après la chirurgie endovasculaire.

II-3- Traitements des AAA et complications

Il faut absolument prévenir la rupture des AAA puisque 60-85% des patients vont en décéder [10, 15, 16]. Il existe deux traitements pour exclure l'anévrisme de la circulation sanguine. La

chirurgie standard est toujours aujourd'hui la méthode classique et c'est par cette méthode que l'on traite la majorité des patients [79]. L'autre alternative est minimalement invasive et consiste en à la pose d'une EC par voie endovasculaire.

II-3-1- Chirurgie : traitement « gold standard »

Le traitement chirurgical « classique » est une chirurgie ouverte de l'abdomen, soit par la mise à plat-greffe avec une ouverture du sac anévrisimal. La greffe est réalisée avec une prothèse vasculaire en textile (Dacron ou ePTFE) qui est, soit de forme tubulaire si l'AAA est limité au segment aortique sous rénal ou de forme bifurquée si AAA s'étend aux iliaques. **Cette prothèse vasculaire remplace le segment malade anévrisimal et elle est anastomosée à l'aorte saine en**

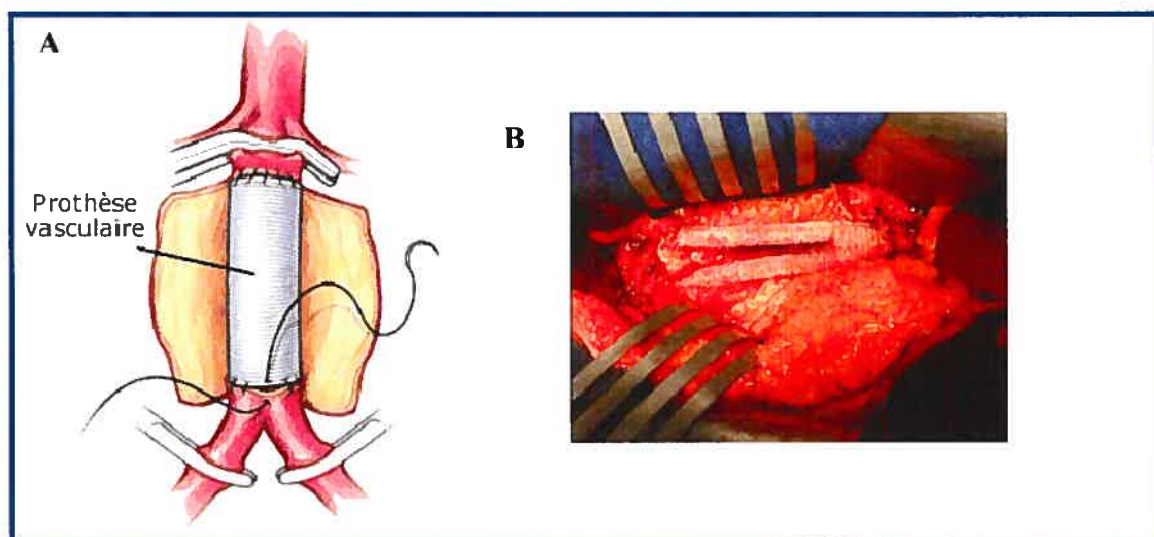


Figure 6 : Chirurgie standard avec la mise en place d'une prothèse vasculaire

A. Prothèse vasculaire sous forme tubulaire. Cette prothèse est solidement fixée à l'aorte par une anastomose qui permet une étanchéité aux collets B. Prothèse vasculaire sous forme bifurquée.

(<http://www.vascularweb.org>)

amont et en aval (Fig. 6). Il n'y a plus de possibilité de rupture secondaire de l'AAA, puisque celui-ci a été retiré.

La chirurgie standard a été bien documentée. C'est un traitement efficace et durable, mais elle est associée à des taux élevés de mortalité et morbidité, soit de 15% jusqu'à 30% pour les patients à haut risque chirurgical [13, 80, 81]. Dans les pays industrialisés, la prévalence et le risque chirurgical augmentent dans la population vieillissante [82, 83]. Un nombre de plus en plus élevé de patients ne peuvent être traités par la chirurgie standard à cause de leur état précaire qui ne permet pas une opération invasive [84, 85].

II-3-2- Chirurgie endovasculaire par la pose d'une EC

II-3-2-1- Historiques et EC actuelles

Le traitement endovasculaire avec une EC, introduit en 1991, est un traitement alternatif à la chirurgie ouverte standard pour les AAA. [86, 87]. L'EC est constituée de deux parties. Premièrement, il y a une charpente faite par un treillis métallique appelée « stent ». La structure métallique possède une force radiale suffisante pour s'opposer à la déformation sous l'effet de la pression artérielle. Le rôle principal de cette force radiale est de maintenir l'EC apposée à la paroi vasculaire et d'empêcher la structure de bouger, bien qu'il n'y ait pas d'anastomose avec l'EC et l'aorte. La seconde partie est le recouvrement polymérique ou greffon qui recouvre l'ensemble du treillis métallique permettant à l'EC d'être étanche. Ce greffon est fixé en de nombreux points à la structure métallique par des sutures pour permettre une bonne stabilité du système. Tout dépendant du modèle, le treillis métallique peut être à l'intérieur ou à l'extérieur

de recouvrement polymérique. Parfois, il y a une partie métallique non recouverte par le greffon au collet proximal de l'EC; cette partie se nomme le «bare-stent». Il existe 2 forme d'EC soit une forme tubulaire, appelée tube aorto-aortique utilisé dans 10% des cas, et une forme bifurquée, appelée aortobi-iliaque, qui est modulaire, c'est à dire au moins 2 segments connectés entre eux lors de la chirurgie. Les EC sont insérées dans un cathéter et par la suite implantée par voie endoluminale à partir de l'artère fémorale, sous contrôle fluoroscopique (Fig. 7). L'abdomen n'est pas ouvert pendant cette procédure.

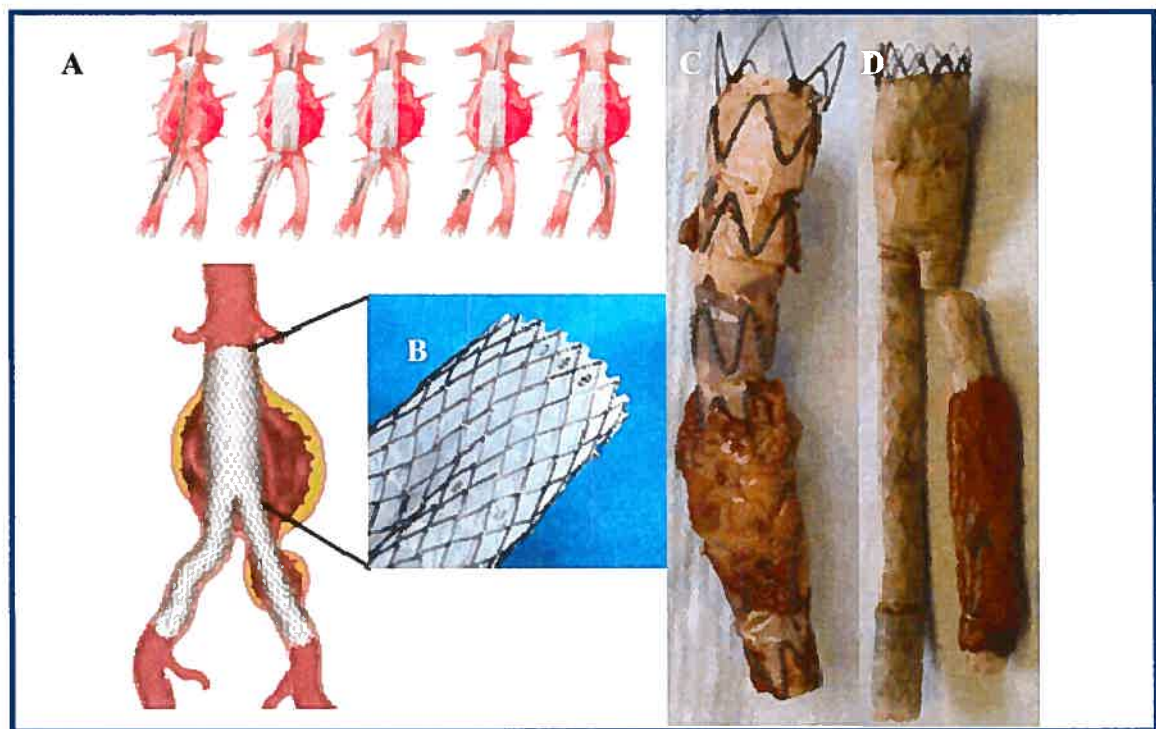


Figure 7 : Structure d'une endoprothèse couverte

A. Déploiement de l'EC dans un AAA B. structure du EC de type AneuRx, la structure métallique est à l'extérieur du greffon C. Structure d'une EC explantée de type Talent de forme tubulaire, appelée tube aorto-aortique. Les Talent ont une partie métallique dénudée, appelé «bare stent». D. Structure d'une EC explantées de type Vanguard modulaire appelé aortobi-iliaque. Les Vanguard ont eu aussi un «bare-stent».

L'avantage du traitement endovasculaire avec une EC est le caractère minimalement invasif de l'intervention qui réduit de manière significative la mortalité/morbidité à court terme [88-94] ainsi que la perte de sang durant la chirurgie, la nécessité de transfusions, le temps d'hospitalisation, la durée de séjour aux soins intensifs, la période de convalescence du patient, la douleur et les cicatrices et même potentiellement le coût de l'intervention [87, 90-92, 95-104]. Il y aurait aussi une réaction inflammatoire systémique moins importante avec les EC [105, 106], quoique certaines études contredisent ce fait [107, 108].

Dans le début des années 90, les EC étaient de confection artisanale. Par la suite, plusieurs types d'EC ont été commercialisés et implantés sur des patients (tableau I). Les prothèses de type Vanguard font partie de la première génération des EC. Il y a eu 3 modèles de Vanguard, mais ce type de prothèse n'a jamais reçu l'approbation de la Food and Drug Administration (FDA). Les Vanguard ont reçu une approbation de la FDA pour procéder à différentes phases d'essais cliniques. A cause des nombreuses complications constatées (notamment de dégradation *in vivo*), ce processus n'a pas mené à une approbation en bonne et due forme par la FDA. Les modèles qui ont été mis sur le marché par la suite, soit la 2^{ème} génération d'EC, devaient être d'une meilleure qualité pour éviter les problèmes rencontrés précédemment. Les EC de type AneuRx et Talent ont vu le jour dans cette 2^e génération d'EC. Malgré les nombreux modèles présentement sur le marché, aucune étude n'a réussi à établir la supériorité d'un de ces modèles [109, 110].

Tableau I: Principaux modèles d'EC commercialisées pour les AAA

<i>Nom prothèse</i>	Stent	graft	Matériau interne/externe	Autres détails
Ancure (Guidant, Menlo Park, CA)	X	Dacron tissé	Graft	Pas de support métallique du graft : anneaux métalliques en Elgiloy, en forme de V pour attache proximale et distale. Graft en un seul morceau avec jambes crépées. *** approuvé par la FDA en 1999 et retiré du marché en 2003***
AneuRx (Medtronic, Sunnyvale, CA)	Nitinol	Dacron	Graft/stent	Environ 1000 sutures pour lier stent et graft Bifurquée, modulaire, pas de partie non recouverte, pas de système de fixation en haut ***approuvé par la FDA en 1999***
Excluder (Gore and Assoc., Flagstaff, AZ)	Nitinol	ePTFE	graft/stent/graft	Petits anneaux en haut pour attache proximale Graft en un seul morceau collé par chaleur sur et sous le stent. ***approuvé par la FDA en 1999***
Talent (World Medical, Sunrise, FL)	Nitinol	Dacron fin (Low Profile System LPS)	Graft/stent/graft	Stent non recouverte au site proximal Multiples stents de support du graft Design tube ou bifurqué Modulaire
Vanguard (Mintech, stentor) (Boston Scientific Corp., Natick, M)	Nitinol	Dacron	stent/graft	Stent non recouverte au site proximal Design en tube ou bifurqué ***maintenant retiré du marché***
Zenith (Cook Inc., Bloomington, IN)	SS 316L	Polyester tissé	stent/graft	Bifurquées, Modulaire Stents en Z pour support du graft Partie non recouverte pour placement suprarenal ***approuvé par la FDA en 2003***
Endologyx (Bard, Covington, Ga)	Elgiloy	PTFE	Stent/graft	Graft seulement attaché au bout proximal et distal du stent ***approuvé par la FDA en 2005***

II-3-2-2- Complications

La diminution du volume de l'anévrisme après un traitement endovasculaire est une bonne indication que la chirurgie endovasculaire a bien réussi [111-113]. L'efficacité des EC est limitée par les fréquentes complications qui sont associées à de hauts risques de rupture de l'anévrisme [114]. Malgré plusieurs avantages liés aux EC, les complications telles que la migration de l'EC, la dégradation de l'implant et les endofuites sanguines (« endoleak ») nuisent à l'utilisation des EC qui reste, au Canada, limitée aux patients inopérables par le traitement classique [115-119] ou âgés de plus de 80 ans [120]. En plus d'imposer un suivi radiologique lourd pour les patients, ces complications peuvent mener à des ré-interventions endovasculaires et/ou à une conversion chirurgicale [121].

Conversion et ré-intervention

Les ré-interventions sont de deux types: intervention endovasculaire et les interventions chirurgicales. Les ré-interventions endovasculaires sont de différentes natures, soit la mise en place d'une extension d'EC ou d'un « stent » pour corriger une fuite ou pour éviter une migration, ou bien une embolisation d'une fuite de type II avec des coils [122-124]. Une seconde intervention endovasculaire doit être faite dans 9.2% à 35% des cas [94, 99, 125, 126] et ce pourcentage monte à 59% pour les EC retirées du marché [125]. Les interventions chirurgicales ne sont que d'un seul type. Elles consistent à retirer l'EC et à la remplacer par une prothèse vasculaire (chirurgie standard). C'est ce que l'on appelle une conversion chirurgicale et elle est pratiquée lorsque l'anévrisme augmente ou qu'il rupture dans 1.6% à 21% des cas selon les études [91, 94, 109, 126-129]. Lorsque le médecin doit procéder à une conversion chirurgicale,

tous les avantages du traitement endovasculaire sont perdus. Cette seconde intervention, après la pose d'une EC, représente plus de risques pour le patient que la chirurgie standard seule [129, 130]. Donc, il faudrait éviter les complications pour améliorer les chances du patient de bénéficier d'une récupération complète. Les chances de rupture de l'AAA après la pose d'une EC sont de 1% par année, et le risque de conversion est de 2.1% par année [114, 131]

Dégradation, résistance à la corrosion et design de l'implant

La dégradation de la structure métallique et/ou du greffon sont la cause de fréquentes complications et ont été mises en évidence par certaines études sur les EC [132-134]. La dégradation de l'implant mène, dans certain cas, à la déformation de celui-ci, ce qui est une cause majeure de complication [135]. La déformation de la prothèse est parfois liée au mauvais design de l'EC [136] ce qui peut provoquer la déformation de la structure, sans que les biomatériaux de l'implant n'aient subi de dégradation. Un design inadéquat soumet les biomatériaux à un stress continu. Il peut alors survenir des bris dans le recouvrement polymérique qui ne résiste pas à cette tension. Les sutures qui tiennent le greffon sur la structure métallique sont aussi soumises à une pression qui peut les faire céder [137]. Tous ces événements mettent l'intégrité et la stabilité de l'endoprothèse en péril. La plicature des jambes des EC en est un bon exemple et mène souvent à la thrombose des jambes iliaques de l'EC. Toutes les déformations dans la structure des EC peuvent entraîner une mauvaise apposition de l'EC à la paroi aortique et compromettre l'exclusion du sac anévrysmal [135].

La résistance à la corrosion de la partie métallique est importante pour éviter la dégradation. Certaines études ont démontré une corrosion des fils métalliques dans les EC [132] qui ont

entraîné des fractures de stress et l'échec des implants [138, 139]. La résistance à la corrosion d'un métal est assurée par une couche d'oxyde qui le protège. La couche d'oxyde qui recouvre le nitinol (NiTi), principal alliage utilisé dans la conception des EC, est principalement constituée d'un oxyde de titane qui offre, en principe, une bonne résistance à la corrosion. L'uniformité et l'épaisseur de cette couche d'oxyde protectrice dépendent des procédés de passivation industrielle utilisés, comme : « chemical etching et electropolishing » [140-142].

La migration des EC

La migration est définie comme le mouvement longitudinal de l'EC de sa position initiale de 5 mm ou plus, généralement vers le bas [143]. Ceci peut entraîner une mauvaise exclusion du sac anévrysmal (endofuite) et ultimement sa rupture si aucune action n'est prise [143]. La migration peut aussi causer la plicature des jambes et/ou la déconnection entre les parties de l'EC [143]. Des études ont montré que la migration est une cause importante de conversion chirurgicale [131] et de ré-intervention [144].

La durabilité à long terme du traitement est affectée par ce problème et il a été noté chez tous les types d'EC [143]. Le pourcentage de migration de l'EC à un an est de 2% [98, 112, 145] et varie généralement entre 3 et 16% selon les études [94, 126, 146-150] mais va jusqu'à 42% dans certains cas [151], ce qui fait de la migration un problème majeur à régler pour le succès de ce traitement endovasculaire. La longueur du collet proximal aurait une influence dans la stabilité de la position de l'EC. Après 3 ans, 22% des patients qui avaient un collet proximal de moins de 1.5 cm présentaient une migration contre 14% pour les collets de plus de 1.5 cm [152]. La présence de crochet au collet proximal de l'EC aide à fixer l'endoprothèse et à prévenir la

migration [153-155], mais ne parvient pas à être aussi solide que l'anastomose d'une prothèse vasculaire [155].

Les endofuites (ou « endoleak »)

Les endofuites sanguines, communément appelées « endoleak », sont définies comme une persistance ou une réalimentation du sac anévrisme par la circulation sanguine et surviennent dans 4-39% des cas [98, 109, 128, 156-164]. Elles sont détectées lors du suivi par imagerie comme une opacification persistante du sac anévrisimal après l'implantation de l'EC. La migration et les bris dans l'EC peuvent mener au phénomène des endofuites [165]. Les endofuites sont de loin le problème le plus important, étant donné le risque de rupture qu'entraîne la reperfusion et l'augmentation du diamètre de l'anévrisme [166-168]. Les endofuites peuvent être classées en deux types, soient primaires si elles surviennent dans les 30 premiers jours ou secondaires si elles apparaissent après plus de 30 jours suivant l'implantation de l'EC [169].

D'un point de vue anatomique les endofuites sanguines observées suite à l'implantation des EC ont été classifiées en 5 types (Fig. 8) [156, 161].

Les endofuites de type I : ont lieu aux collets proximal ou distal, et sont causées par la persistance de la circulation sanguine entre l'EC et la paroi aortique aux extrémités du SG. L'angulation du collet proximal semble jouer un rôle dans ce type de fuite [170].

Les endofuites de type II : proviennent d'un flux sanguin rétrograde par des branches collatérales (artères lombaires, artère mésentérique inférieure ou autres) venant réalimenter le sac anévrisimal. L'épaisseur et la position du TIL dans l'anévrisme auraient aussi une influence sur le développement de fuite de type II selon une étude [171].

Les endofuites de type III : sont dues à un bris dans le recouvrement polymérique ou d'une déconnection entre 2 parties de l'EC.

Les endofuites de type IV : sont dues uniquement à la porosité du recouvrement polymérique.

Les endofuites de type V : appelées endotension se traduisent par une augmentation de taille de l'anévrisme après implantation du EC due à une pressurisation persistante du sac anévrismale, sans que l'on voit d'endofuites sur les images de suivi [156, 172, 173].

Les endofuites de type IV tendent à guérir d'elle-même. Les endofuites de type I et de type II, sont les plus fréquentes et problématiques sur le plan clinique. Les endofuites de type I et III mènent systématiquement à une ré-intervention endovasculaire ou chirurgicale, puisqu'elles peuvent entraîner la rupture de l'anévrisme [169]. La manière de traiter les endofuites de types II ne fait pas consensus, alors que certains prônent l'observation plus stricte, d'autres favorisent une intervention [166, 169, 174-176].

II-3-3- Les mécanismes d'échecs des EC

Les causes d'échec des EC sont encore mal élucidées. Des études ont montré l'implication des facteurs mécaniques reliés à un design inadéquat dans plusieurs cas d'échec, notamment les cas de thrombose lié à la plicature ou les endofuites de type III [132, 133, 135] et l'implication de la dégradation des biomatériaux [177, 178, 179]. D'autres études sur des EC explantées chez l'humain ont démontré un manque d'incorporation biologique de l'EC à la paroi aortique et un manque de guérison du sac anévrisimal [154, 180, 181]. Les mécanismes menant à ces échecs ou qui facilitent leur apparition sont encore mal compris et trop peu d'études ont été faites à ce sujet [182].

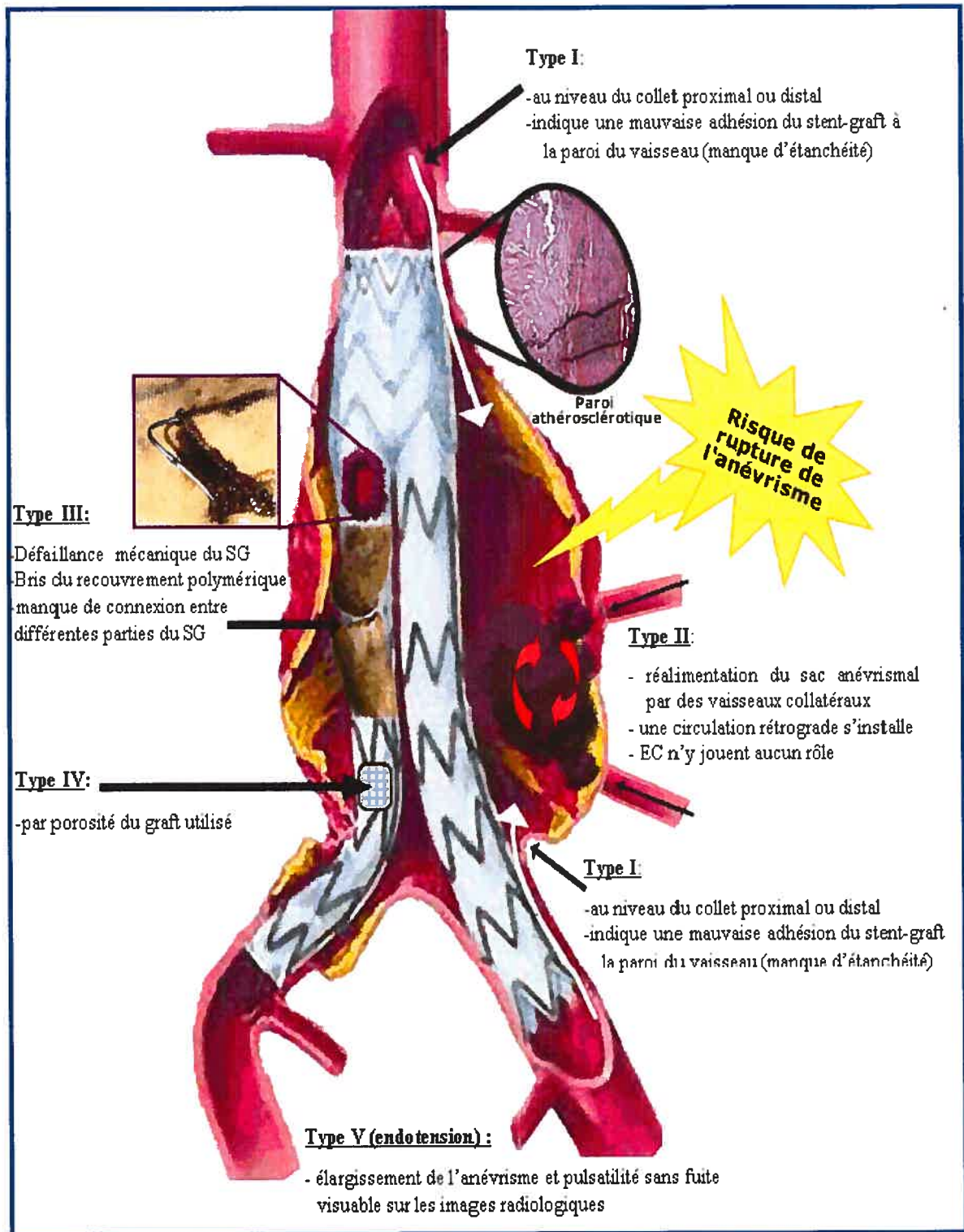


Figure 8 : Schéma et explication des différents types d'endofuites sanguines

Bien que des essais *in vitro* permettent de prédire en partie certains risques de complication, **l'analyse d'EC explantées après une autopsie ou de conversion chirurgicale est une source d'information essentielle sur l'adaptabilité *in vivo* et sur les mécanismes impliqués dans les cas d'échec.** La compréhension de ces mécanismes pourrait permettre d'élaborer des stratégies pour réussir à éviter les complications couramment rencontrées actuellement. Si les complications étaient réglées, 35-45% des AAA pourrait être traités par EC, comparativement à 15% en 2000 [183, 184]. Ce serait un grand progrès!

II-4- Mécanismes d'incorporation des EC

II-4-1- La guérison vasculaire en général

Dans un processus physiologique, plusieurs étapes sont nécessaires pour obtenir une guérison complète suite à une insulte vasculaire. Lorsqu'un implant vasculaire est mis en place, la première étape est l'adsorption de protéines à sa surface. Ensuite, les cellules vont s'attacher via des récepteurs sur ces protéines adsorbées. Les CMLV et fibroblastes sont les principales cellules responsables de la réparation vasculaire normale [185]. La résistance à l'apoptose, la prolifération et la migration des CMLV est nécessaire à la formation d'une néointima organisée [186-190]. Pour ce qui est des fibroblastes, ils peuvent se différencier en myofibroblastes et ensuite migrer jusqu'à la néointima [191]. Ils seraient les premiers à réagir dans le processus de réparation [192]. Les myofibroblastes sont des cellules spécialisées qui expriment principalement l'alpha- smooth muscle actine (α -SMA), comme les CMLV, et des fibres de

stress, comme les fibroblastes, pour répondre à une insulte, dans un processus normal de réparation cellulaire. Les myofibroblastes sont présents dans tous les types de réparations, ce qui fait d'eux la cellule centrale de tous les processus de réparation. Les myofibroblastes peuvent sécréter une quantité importante de MEC, en plus d'avoir un phénotype contractile qui leur permet de faire la contraction des plaies. Ce sont des cellules qui ont des caractéristiques des fibroblastes et des CMLV [193, 194].

Des données récentes suggèrent que les cellules souches mésenchymateuses (MSC), pluripotentes, participent à la formation de néointima dans un contexte normal de réparation vasculaire [195-197]. Les MSC sont positives à α -SMA dans les modèles vasculaires de lésion [197-199]. Ce mécanisme serait celui par défaut utilisé pour régénérer les CMLV ou le mécanisme de réparation suite à un dommage sévère.

II-4-2- Guérison autour des EC

Dans notre modèle, l'insulte vasculaire est la mise en place et la présence de l'EC et l'endommagement de la paroi artérielle. Le processus de guérison normal devrait tendre à incorporer l'EC dans une capsule fibreuse. Une bonne incorporation de EC à la paroi aortique, surtout au collet proximal et distal de l'anévrisme pourrait permettre de réduire les risques de endofuites de type I et V, la migration de l'EC et aiderait à obtenir définitivement une exclusion complète du sac anévrisimal. La mise en place de la prothèse peut endommager l'intima, la média et l'adventice de l'aorte ce qui peut affecter la guérison à long-terme [200]. Après l'implantation d'une EC, il se forme un thrombus frais par coagulation du sang, entre l'EC et la paroi de l'anévrisme, ainsi qu'à la surface luminale de l'EC. Ce caillot devrait évoluer vers un

tissu organisé et devenir le principal lieu et substrat pour les prochaines étapes du mécanisme de guérison, incluant l'inflammation, la formation de tissu de granulation et la réorganisation en tissu conjonctif [201]. Le caillot est composé de fibrine, une matrice dans laquelle les cellules de l'inflammation et de la réparation vont pouvoir migrer et proliférer. Les plaquettes produisent des facteurs de croissance tels que le PDGF, TGF- α et TGF- β qui sont des chemoattracteurs des cellules musculaires lisses, inflammatoires et des fibroblastes. Les fibroblastes sont impliqués dans l'organisation du thrombus et la fibrose, via la synthèse de collagène et de protéoglycans en se différenciant en myofibroblaste [202].

Dans le cas de nombreux implants vasculaires, la réaction fibroproliférative engendrée lors de la guérison vasculaire mène à la formation excessive de tissu [203-206]. La resténose des « stents » due à une hyperplasie néointimale en est un bon exemple [65]. Dans le cas des EC, il semble qu'au contraire, la réaction fibroproliférative autour des EC est plutôt déficiente. Les études antérieures sur les modèles animaux d'anévrisme, notamment par l'équipe du Dre. Lerouge ont montré que des EC implantées ne s'incorporent pas bien dans la paroi aortique [207, 208]. Dans le même sens, les quelques études histopathologiques sur des EC explantées lors d'autopsie ou de conversion chirurgicale démontrent que l'incorporation tissulaire des EC est faible et incomplète, même après plusieurs mois, ou même plusieurs années [154, 180, 181, 209]. Le manque de guérison observé ne permet pas à l'EC d'être solidement fixée à la paroi aortique, ce qui entraîne des complications fréquentes.

Peu d'études ont été effectuées jusqu'à aujourd'hui pour améliorer la guérison autour de ce type d'implant [210, 211]. La modification de la surface des biomatériaux des EC ou la présence d'un médiateur connu pour favoriser la formation néointimale, pourrait

améliorer l'incorporation de l'EC à la paroi. Cette EC bioactive devrait, dans notre modèle, permettre aux CMLV et aux fibroblastes de migrer jusqu'à l'implant, d'y adhérer et d'y proliférer tout en résistant à l'apoptose et aux fibroblastes de se différencier en myofibroblastes.

II-4-3- Les médiateurs connus de la guérison vasculaire

L'ajout de médiateurs bioactifs qui peuvent interagir avec les intégrines ou d'autres récepteurs cellulaires pourrait améliorer la guérison vasculaire. Les facteurs de croissance plus précisément TGF- β 1, PDGF, bFGF, jouent un rôle central dans la réparation vasculaire [212-215], mais ils sont dispendieux et, à part le bFGF, difficiles à attacher à la surface et à stériliser sans altérer leur bioactivité. Les composantes de la MEC (collagène, protéoglycans, protéine ou peptide d'adhésion) sont impliquées dans les interactions entre la cellule et la surface et sont aussi utilisées pour influencer le comportement de la cellule sur la surface des biomatériaux [211, 216, 217]. L'utilisation des peptides d'attachement contenant le motif RGD (arginine- glycine- aspartate) pour contrôler l'adhésion cellulaire est en croissance. Ce motif permet une adhésion spécifique à des récepteurs cellulaires de la famille des récepteurs intégrines [218, 219] et d'augmenter le nombre et l'étalement des cellules [220, 221]. Par contre, ce peptide ne recrée pas la majorité des processus nécessaires à l'initiation d'une réaction fibro-proliférative, particulièrement la résistance à l'apoptose, une étape importante dans notre modèle. L'augmentation de la capacité des cellules de résister à l'apoptose par l'activation de la voie de la capase-3 a été rapporté [222], mais des investigations plus poussées sont requises. Les facteurs de croissance comme le bFGF peuvent améliorer la guérison, mais entraînent une recanalisation du thrombus. [223, 224], ce qui est un facteur de risque important pour développer des endofuites de type II.

II-4-4- La chondroïtine sulfate (CS), un nouveau médiateur de la réparation vasculaire récemment découvert

Le perlécan, une molécule de 467 kDa, est le principal HSPG des membranes basale [225, 226], donc il est présent en quantité importante dans l'arbre vasculaire [227]. Les CEV produisent des HSPG, incluant le perlécan [228]. Le perlécan contient des glycosaminoglycannes, comme la chondroïtine sulfate (CS) [229, 230]. Le perlécan contient 5 domaines et sa structure est illustrée à la figure 9. Le perlécan en entier ou dénaturé et ses différentes parties jouent un rôle dans l'adhésion des cellules et il pourrait jouer un rôle important dans le remodelage vasculaire et la guérison [225, 227, 231], particulièrement le domaine V qui contient 2 sites d'attache pour la CS [232].

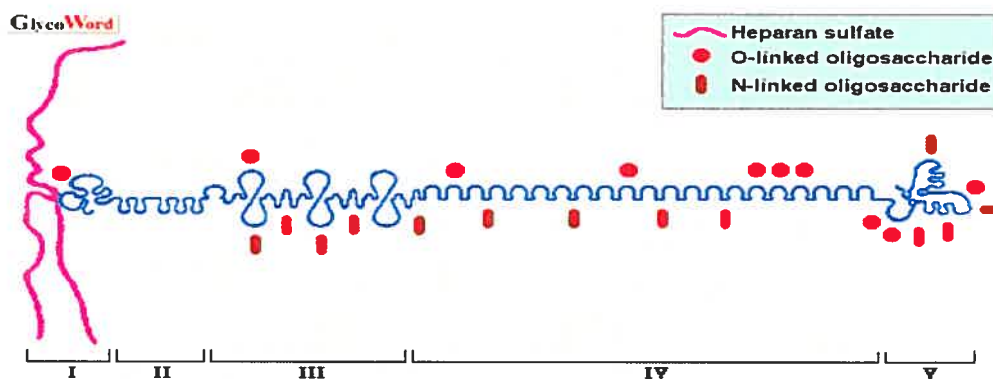


Figure 9 : Structure du perlécan

(<http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/protcoglycan>)

L'équipe du Dr. Marie-Josée Hébert au CHUM a récemment découvert que les cellules endothéliales soumises à un stress comme la privation de nutriment relâchent des médiateurs

dans leur environnement qui ont un effet paracrine sur les cellules environnantes, notamment une résistance à l'apoptose [233, 234]. Le domaine V du perlécan qui porte un site d'ancrage pour la CS a été détecté parmi ces médiateurs et participe à la réaction fibroproliférative initiée par ces médiateurs. Il a été démontré que la CS (Fig. 10) favorise la résistance à l'apoptose [232] et la migration des CMLV [235]. En plus, elle favorise la résistance à l'apoptose des fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes [234].

La CS joue un rôle important dans la guérison en général, notamment en régulant l'activité des facteurs de croissance [236]. De plus, la CS a démontré ses capacités de réparation dans différents modèles de guérison, notamment une augmentation de la guérison tissulaire des muqueuses sous la forme d'un hydrogel [237] et des plaies cutanées [238], une amélioration de la guérison des yeux suite à une chirurgie au laser [239] et en prise orale avec de la glucosamine une régénération du cartilage [240]. La CS a un rôle important dans les processus de guérison cellulaire et est un médiateur intéressant à étudier dans notre modèle anévrismal.

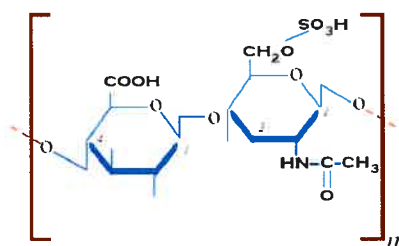


Figure 10 : Structure de la chondroïtine sulfate

II-5- Modification de surface des biomatériaux

L'attachement de molécules bioactives à la surface n'est pas la seule solution pour modifier la surface des biomatériaux. Les recouvrements polymériques sont une autre alternative. La technique par plasma permet de déposer des polymères à la surface des biomatériaux ou de greffer des groupements fonctionnels. En premier lieu, il est important de savoir quels sont les matériaux présentement utilisés et les problèmes rencontrés dans leur utilisation. Ensuite, la modification par plasma sera abordée et finalement, un revêtement polymérique novateur sera décrit.

II-5 -1- Biomatériaux actuels et leurs propriétés

La guérison vasculaire est fortement influencée par les biomatériaux utilisés. Le recouvrement polymérique des EC, présentement commercialisées, est fabriqué en polyéthylène-téréphthalate (PET) ou en polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE) (Fig. 11).

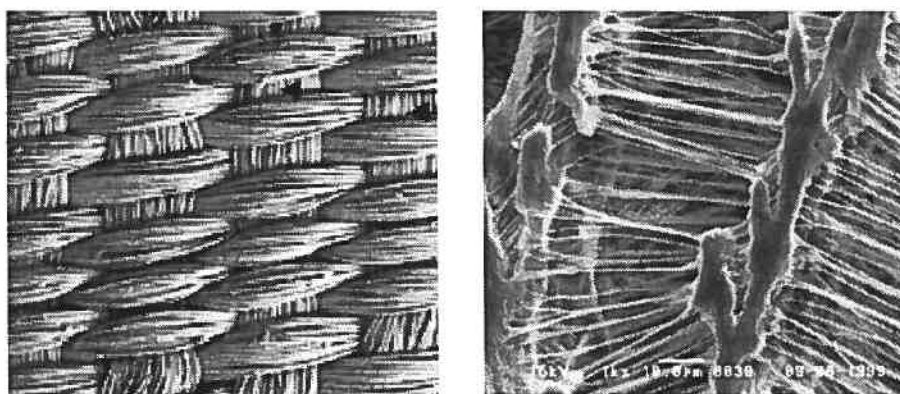


Figure 11 : Structure du PET et du ePTFE

A. Structure microscopique, au MEB du PET [134], **B.** Structure microscopique du ePTFE [245].

Ces biomatériaux ont été choisis pour leur longue utilisation dans les prothèses vasculaires et leurs excellentes propriétés mécaniques, leur relative inertie et leur faible thrombogénicité [241-246].

Le PET est un polyester utilisé sous forme de fibres tissées ou tricotées, appelé Dacron ®. Il est largement utilisé dans la confection des prothèses vasculaires. Le ePTFE est un matériau très inerte. La grande hydrophobicité de ePTFE limite l'adsorption des protéines et l'adhésion des cellules [247, 248] et le ePTFE n'est pas assez poreux pour être bien incorporé [243]. Le PET est moins inerte que le PTFE [249], mais il a été démontré que son incorporation est insuffisante [203, 209, 244, 246, 250]. Pour le moment, les propriétés des matériaux utilisés dans les EC ne sont pas adéquates. La modification de surface des biomatériaux permet d'optimiser les interactions avec le milieu biologique (biocompatibilité) sans altérer les propriétés mécaniques des biomatériaux utilisés.

II-5-2- Modification de surface par plasma

Les procédés par plasma constituent une voie intéressante pour la modification de la surface. Le plasma souvent défini comme le 4^{ème} état de la matière. Quand un solide reçoit une certaine quantité d'énergie, les mouvements des atomes à l'intérieur augmentent, et dans un premier temps, le solide va passer à la phase liquide, puis à la phase gazeuse. Si l'apport d'énergie continue, les mouvements dans le gaz deviennent violents et les molécules vont entrer en collision les unes avec les autres et finalement se briser en sub-particules d'électrons ou d'ions. Lorsque la matière est rendue à ce stade, elle est sous forme de plasma. Avec la température et la pression atmosphérique de la terre, ce phénomène ne se produit pas, sauf dans certaines

circonstances exceptionnelles qui donnent lieu à de magnifiques aurores boréales dans le nord du Québec par exemple. Nous pouvons par contre créer un plasma en laboratoire en appliquant un courant électrique dans un gaz [251].

Les décharges par plasma peuvent être utilisées pour fonctionnaliser une surface, la graver ou déposer un film fin, l'effet variant selon les gaz et paramètres expérimentaux choisis. Cette technique a de nombreux avantages, notamment sa rapidité et sa reproductibilité [252]. Il existe de nombreuses applications, notamment dans le domaine biomédical. Ainsi, il est possible de fonctionnaliser une surface avec des groupements hydroxyles ou amines afin de modifier les propriétés d'une surface et/ou de pouvoir ensuite y attacher une molécule d'intérêt. Par exemple, les plaques de culture cellulaire en polystyrène, présentement commercialisées, sont fonctionnalisées par plasma [253]. Les groupements fonctionnels ainsi créés à la surface, par exemple carboxyles ou amines peuvent augmenter l'adhésion [220, 254-258] et la prolifération [256, 257] *in vitro*. Il est également possible de créer par plasma des films qui ont une nouvelle composition chimique. Nous avons récemment mis au point un nouveau polymère déposé par plasma (ci-après appelé PPE:N « N-doped plasma-polymerised ethylene ») extrêmement riche en azote (N).

II-5-3- Le PPE :N... un revêtement novateur

Ce nouveau polymère a été développé et breveté à l'École Polytechnique de Montréal par l'équipe du Dr. Michael Wertheimer. Ce revêtement a une haute concentration en azote et une haute énergie de surface qui le rendent très prometteur pour améliorer la biocompatibilité ou la guérison vasculaire [257]. Le gaz précurseur du PPE:N est un mélange d'éthylène (C_2H_4) et

d'azote (N_2) auquel on applique un haut voltage dans un environnement qui est à la pression atmosphérique. Le fait de travailler à la pression atmosphérique facilite les manipulations et économise du temps.

La composition du PPE:N a été obtenue par spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS « X-ray photoelectron spectroscopy ») et par spectroscopie à infrarouge. Aucune étude ne rapporte un taux d'azote aussi haut, soit 36.3%. En plus, il a été démontré par XPS et angle de contact que le polymère est stable dans le temps. Il contient notamment des groupements amines. Le PPE:N augmente l'adhésion des macrophages et des chondrocytes après une heure *in vitro* [257]. Les macrophages sont capables d'y proliférer pendant plusieurs jours, ce qui laisse supposer que le PPE:N n'est pas toxique pour les cellules [257]. En plus, le PPE:N peut aussi modifier la différenciation des cellules souches mésenchymateuses [258, 259]. Ce revêtement déposé par plasma pourrait favoriser l'adhésion des cellules de la réparation vasculaire et aider à la guérison autour des EC.

II-6- Objectifs

Mon projet de maîtrise s'articule autour de deux objectifs distincts et bien précis. Mon premier objectif est d'**analyser des EC explantées lors d'autopsies ou de conversions chirurgicales, pour acquérir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les cas d'échec ou de réussite. En particulier**, 1) évaluer la dégradation *in vivo* des différentes EC ; 2) caractériser les tissus autour des implants et 3) déterminer le rôle de la dégradation et du manque de guérison biologique dans les cas d'échec, notamment en comparant des cas d'échec et de réussite.

Notre deuxième objectif est **d'évaluer le potentiel du revêtement PPE:N déposé par plasma et du médiateur récemment identifié, la CS, pour favoriser une réaction fibroproliférative et ainsi améliorer l'incorporation de l'EC à la paroi aortique.** Ceci sera testé par expérimentation *in vitro* avec des cellules impliquées dans la guérison vasculaire (CMLV et fibroblastes) sur des films en PTFE et PET. Les objectifs spécifiques sont les suivants. 1) évaluer les effets du PPEN, sur l'adhésion, la migration, la croissance cellulaire, la résistance à l'apoptose et la différenciation cellulaire ; 2) évaluer les effets de la CS sur l'adhésion, la migration, la croissance cellulaire, la résistance à l'apoptose et la différenciation cellulaire ; 3) déterminer s'il existe une synergie entre le PPE :N et le CS.

CHAPITRE III - PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

III-1- Analyse d'EC explantées

III -1-1- Données cliniques

Ce projet a été approuvé par le comité d'éthique du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Les deux formulaires de consentement utilisés (conversion chirurgicale ou autopsie) sont en annexe de ce document. Les douze EC explantées ont été récupérées par autopsie (3) ou par conversion chirurgicale tardive (9). Lors de l'autopsie, l'anévrisme complet a été retiré, des artères sous rénales à la moitié des artères fémorales, et fixé dans la formaline. Pour les cas de conversion chirurgicale, un maximum de tissus entourant l'endoprothèse a été récupéré par le chirurgien vasculaire pour permettre l'analyse de l'interface entre l'implant et les tissus. Toutes les autres données cliniques (durée de l'implantation, raison de la chirurgie, complication,...) sont précisées dans l'article I.

III -1-2- Test non- destructifs

III-1-2-1- Analyse macroscopique

Les spécimens ont, en premier lieu, été soumis à des tests non destructifs, dont une analyse macroscopique. La morphologie, la quantité et l'attachement des tissus à l'EC ont été examinés

et notés. L'intégrité de la structure métallique, du recouvrement polymérique et des sutures ont aussi été observées à l'œil nu et sous stéréomicroscopie afin de détecter les altérations que la structure pourrait avoir subies *in vivo*.

III-1-2-2- Techniques d'imagerie

Plusieurs techniques d'imagerie ont été utilisées. Premièrement, les CT-scan, les rayon-X et les images d'angiographie de l'anévrisme des patients, avant et après le traitement, ont été analysés pour détecter des anomalies et faire des corrélations avec les images *ex-vivo* et l'histopathologie. Des rayon-X *ex-vivo*, utilisant les mêmes paramètres que pour une radiographie abdominale (50 kVp, 400 mPA et 2.6ms), ont été pratiqués sur la plupart des spécimens pour vérifier l'intégrité de la structure métallique qui, souvent, était à l'intérieur de l'EC ou cachée par du tissu ou l'anévrisme. Sur un spécimen d'autopsie, des images de résonance magnétique (Sonata 1.5 Tesla, Siemens, Erlinger, Allemagne) et d'échographie (Vivid 5, Général Électrique) ont été récoltées pour analyser l'homogénéité du thrombus dans le sac anévrismal (Fig. 12).

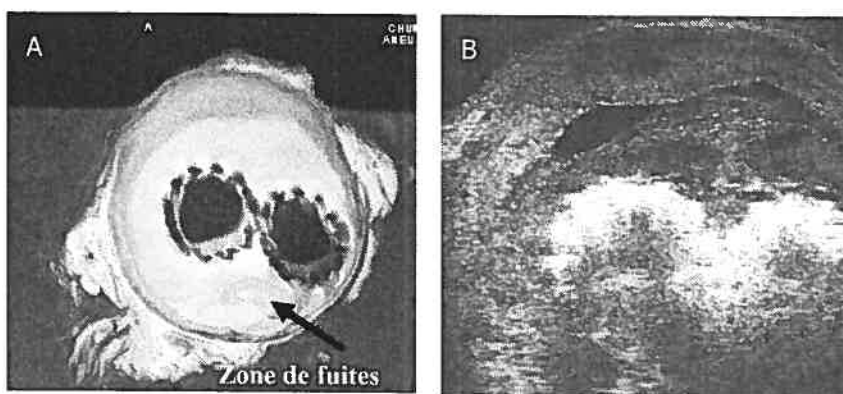


Figure 12: Hétérogénéité du thrombus

A. Image en résonance magnétique (*ex vivo*), la flèche indique une zone où il y avait une fuite 3 jours après l'implantation. **B.** Image échographique qui montre une zone du thrombus qui n'est pas homogène.

III-1-3- Tests destructifs

III-1-3-1- Histologie

Pour effectuer des coupes histologiques, nous avons un défi à relever. Nous voulions préserver l'interface entre les tissus mous et la partie métallique de l'implant (« stent ») sans abîmer l'interface entre les deux. L'histologie conventionnelle ne nous permettait pas cette approche. Nous avons donc utilisé le système Exakt.

Histologie avec le système Exakt

Le système Exakt (Exakt GmbH, Norderstedt, Allemagne) (Fig. 13) est un microtome qui permet de couper les spécimens (contenant une partie dure, métallique ou os non déminéralisé) en conservant l'interface entre les tissus et l'implant. Les spécimens sont tout d'abord coupés en sections macroscopiques de 1 à 2 cm. Après que ces sections macroscopiques aient été examinées et photographiées, elles servent à préparer des coupes histologiques qui contiennent l'interface tissu/implant qui nous intéresse. Les tissus ont été déshydratés avec des concentrations croissantes d'éthanol, soit 70%, 80%, 95% et 100%. Ensuite, les tissus ont été incorporés à une résine d'acrylique, le Technovit 7200, selon la cédule suivante :

- 1) 30% Technovit 7200 / 70% éthanol pendant 2 jours
- 2) 70% Technovit 7200 / 30% éthanol pendant 2 jours
- 3) 100% Technovit 7200 usagé pendant 2 jours
- 4) 100% Technovit 7200 neuf pour un minimum de 4 jours

Par la suite, le Technovit 7200 polymérise à la lumière pendant 12 heures. Certains spécimens contenaient du thrombus en quantité importante. Étant donné que la polymérisation du Technovit 7200 se fait à la lumière, certaines parties de ces tissus ne parvenaient pas à polymériser totalement à cause de l'opacité du thrombus. Dans ces cas, nous avons utilisé comme résine le poly-méthyl-méthacrylate (PMMA) qui polymérise à 37°C. Les étapes suivantes ont été effectuées pour l'incorporation dans le PMMA :

- 1) Xylène pendant 4 jours (changement du Xylène après 2 jours)
- 2) PMMA + Dibutyl-phthalate 4 :1 (v/v) pendant 2 jours
- 3) PMMA + Dibutyl-phthalate 4 :1 (v/v) + 1% (w/v) Benzoyl peroxyde pendant 2 jours
- 4) PMMA + Dibutyl-phthalate 4 :1 (v/v) + 3% (w/v) Benzoyl peroxyde pendant 3 jours
- 5) PMMA + Dibutyl-phthalate 4 :1 (v/v) + 3% (w/v) Benzoyl peroxyde pendant la polymérisation, environ 10 jours

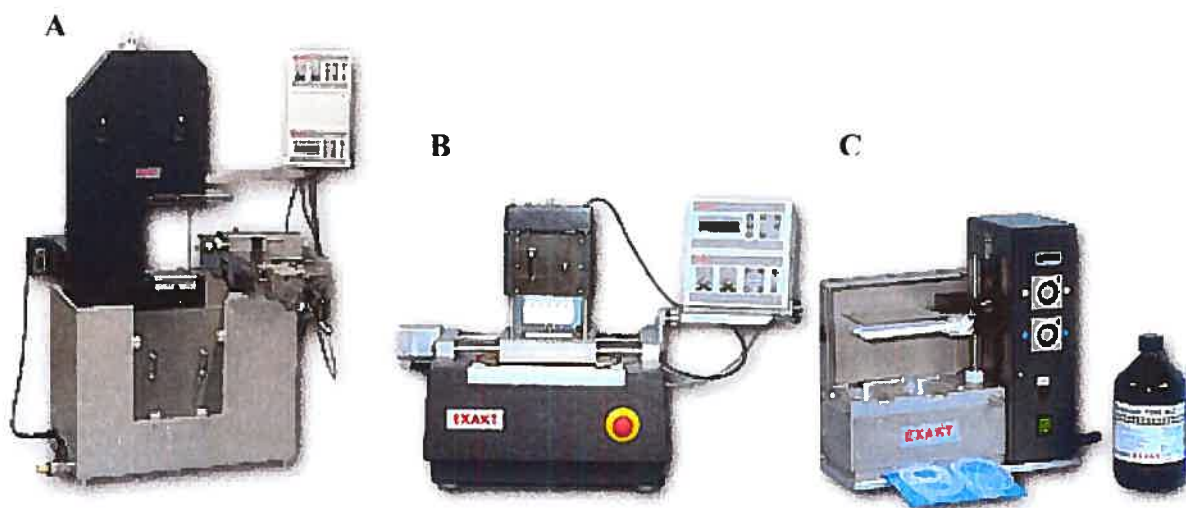


Figure 13: Système Exakt

A. Scie à diamant B. Système de sablage C. Appareil à polymérisation du Technovit 7200

Une fois les tissus polymérisés dans l'une ou l'autre des résines, ils sont coupés et polis par une succession de papier à sabler pour arriver à des coupes d'une épaisseur de 30 μm . Les coupes sont par la suite colorées à l'hématoxyline et l'éosine (H&E) et observées au microscope optique.

Histologie conventionnelle et immunohistochimie

Dans certaines sections macroscopiques, l'implant a été retiré pour préparer des coupes histologiques conventionnelles, incorporées dans la paraffine, d'une épaisseur de 3 μm pour permettre une meilleure caractérisation des tissus. Toutes les lames histologiques, ainsi obtenues, ont été colorées à l'hématoxyline et éosine. D'autres colorations, plus spécifiques ont aussi été utilisées. La coloration du Trichrome de Masson et celle de Von Kossa ont été utilisées pour détecter respectivement le collagène et les dépôts de calcium. La coloration de Gram et le « periodic acid schiff (PAS) » ont été utilisés pour identifier des microorganismes dans un cas suspecté d'infection. Finalement, une coloration immunohistochimique de l' α -actine a été effectuée pour détecter la présence de CMLV ou de myofibroblastes caractérisés par les filaments d'actine.

III-1-3-2- Analyse de surface

Certaines parties des EC explantées (fils métalliques et recouvrement polymérique) ont été nettoyées pour pouvoir analyser leur surface et son intégrité. Ces échantillons ont d'abord dû être nettoyés pour enlever les tissus, de la manière suivante :

- 1) Enlever manuellement le plus de tissus possible.
- 2) Rincer à l'eau distillée et déionisée.

- 3) Dans un bain à ultrason, laisser 4 heures dans une solution enzymatique ZYMIT® 2%.
(Changer la solution au bout de 2 hrs s'il y a beaucoup de tissus)
- 4) Vérifier que les échantillons sont exempts de tissus, sinon laisser 1 heure supplémentaire dans une nouvelle solution de ZYMIT® 2% pour enlever le tissu qui reste.
- 4) Dans un bain à ultrason, laisser 5 minutes dans de l'acétone.
- 5) Dans un bain à ultrason, laisser 5 minutes dans du méthanol.
- 6) Garder les échantillons dans un contenant propre, à l'abri de la poussière.

Lorsque les échantillons sont propres, nous pouvons procéder aux analyses de surfaces soit par Microscopie Électronique à Balayage (MEB) ou par Spectroscopie Auger (AES « Auger Electron Spectroscopy ») La MEB a été utilisée pour voir la structure microscopique et/ou les altérations à ce niveau. L'AES a été employée pour caractériser l'épaisseur et la composition de la couche d'oxyde sur les fils métalliques.

Microscopie électronique à Balayage (MEB)

Les images ont été réalisées avec un MEB de type Hitachi S-3500. Tous les échantillons ont été recouverts d'or-palladium avant d'être observés. Les fils métalliques des EC explantées et des fils contrôles non implantés ont été observés en mode backscattering à 15 kV de voltage d'accélération. Des parties du recouvrement polymérique ont aussi été examinées au MEB.

Spectroscopie Auger (AES « Auger electron spectroscopy »)

La spectroscopie Auger (AES) est couramment utilisée pour analyser la composition chimique des surfaces métalliques. Cette technique permet de caractériser de manière précise les premières

couches atomiques de la surface entre 1 et 5 nm de profondeur. Le principe est que la substance, préalablement excitée par un électron incident de forte énergie, se fait arracher un électron d'un de ses niveaux d'énergie. Un autre électron, issu d'un niveau moins énergétique vient le remplacer. Ce second changement de couche électronique oblige l'atome, pour rééquilibrer son bilan énergétique à émettre un électron secondaire qui formera le rayonnement Auger (CF. Fig. 14).

De plus, lorsque l'AES est associée à un système de décapage de la surface à l'argon, nous pouvons obtenir des profils des différents constituants du matériau étudié, en fonction de la profondeur à laquelle on est rendue. Dans le cas des métaux, cette technique d'analyse de surface permet de caractériser la couche d'oxyde formée à la surface. L'uniformité de cette couche d'oxyde est importante pour que la surface conserve son intégrité et résiste à la

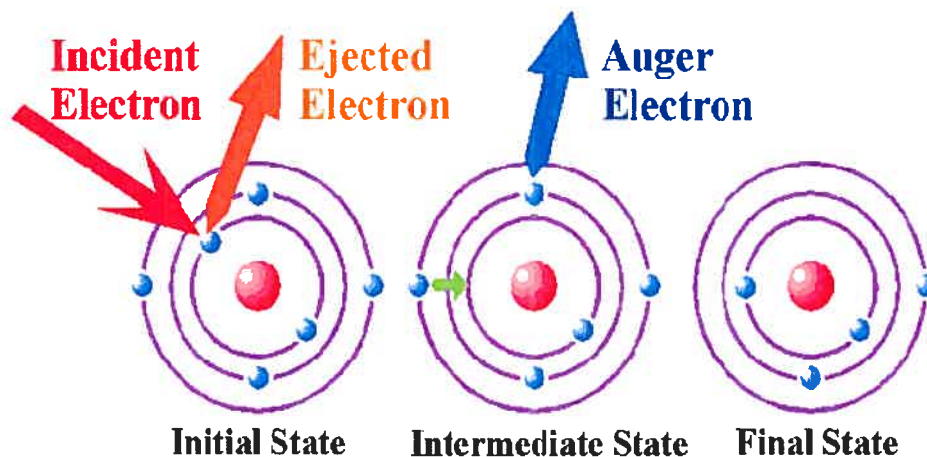


Figure 14: Mécanisme de fonctionnement de l'émission des électrons d'Auger

Sous l'effet d'un électron incident qui excite le matériau, le retour de l'équilibre sera effectué en émettant un électron d'Auger caractéristique de l'élément chimique qui est présent à la surface.

(http://www.thermo.com/com/cda/products/product_application_details/1,1063,11250,00.html)

corrosion. Théoriquement, dans le cas du nitinol, la couche d'oxyde qui se forme naturellement est un oxyde de Ti, qui protège bien l'alliage de la corrosion. La composition, l'homogénéité et l'épaisseur de cette couche d'oxyde dépendent des processus industriels de passivation utilisés et des traitements de mise en forme. Le Ni ne doit pas se retrouver en surface du NiTi, où il pourrait être relargué, et nuire à la biocompatibilité. Nous avons donc vérifié la présence de Ni à la surface et calculé le rapport de Ni et du Ti en surface.

Nos analyses ont été conduites avec un AES de type JAMP 30 (Joel, Japon) (Fig. 15). Tout d'abord, le taux de décapage de l'appareil est obtenu en utilisant un standard de silicium, dont on connaît l'épaisseur de la couche d'oxyde (500 Å) (Fig. 16a). Ensuite, un spectre de survol a été effectué pour déterminer les éléments chimiques qui sont présents à la surface des échantillons dans le mode dérivatif avec une énergie de 10 keV (Fig. 16b). Le profil a été obtenu par un bombardement à l'argon sur le même échantillon et au même endroit que le spectre a eu lieu. Un minimum de 3 spectres/profils a été fait pour chaque EC explantée. L'épaisseur de la couche d'oxyde a été déterminée en évaluant le temps de décapage nécessaire pour atteindre la mi-hauteur du pic d'oxygène (Fig. 16c).

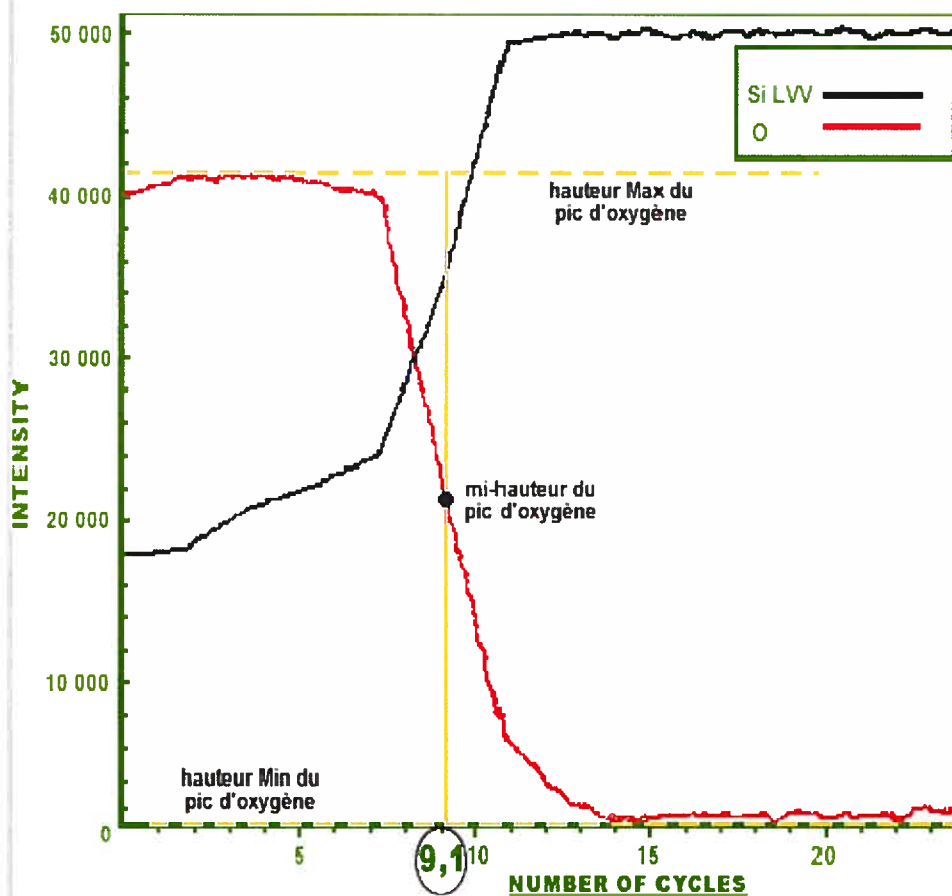


Figure 15: JAMP-30

Photographie du AES couplé à un système de décapage à l'argon, utilisé pour effectuer nos analyses

A

STANDARD DE SiO_2
 ---COUCHE D'OXYDE DE 500 Å---

**CALCULS**

2) nombre de cycle pour traverser la couche d'oxyde de 500 Å : 9,1 cycles

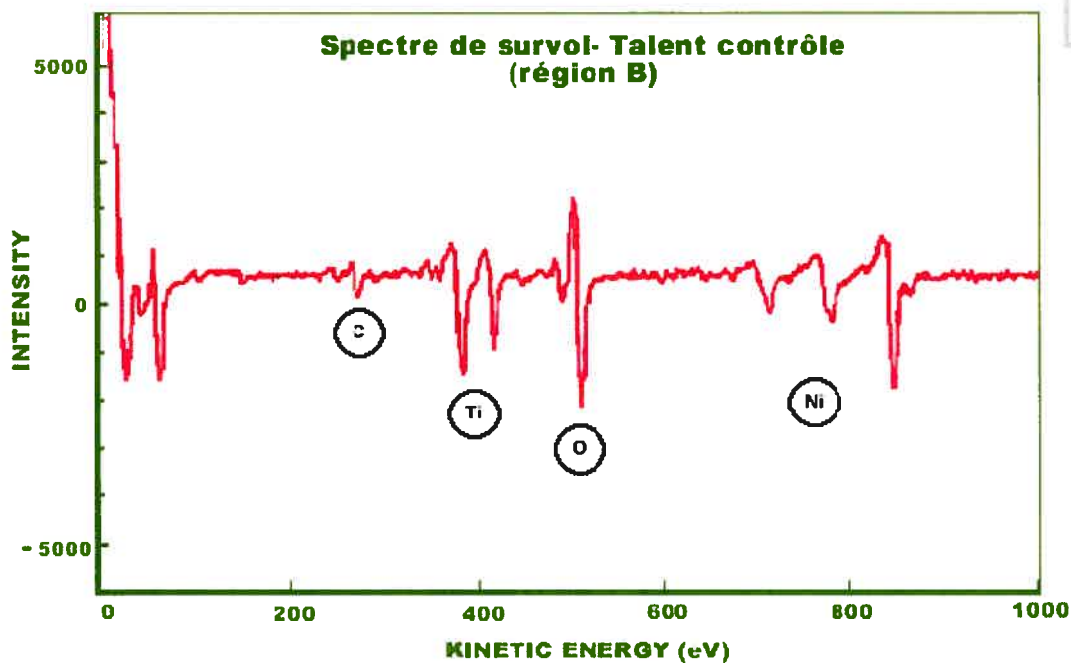
3) Nombre de secondes requises pour décaper la couche d'oxyde :

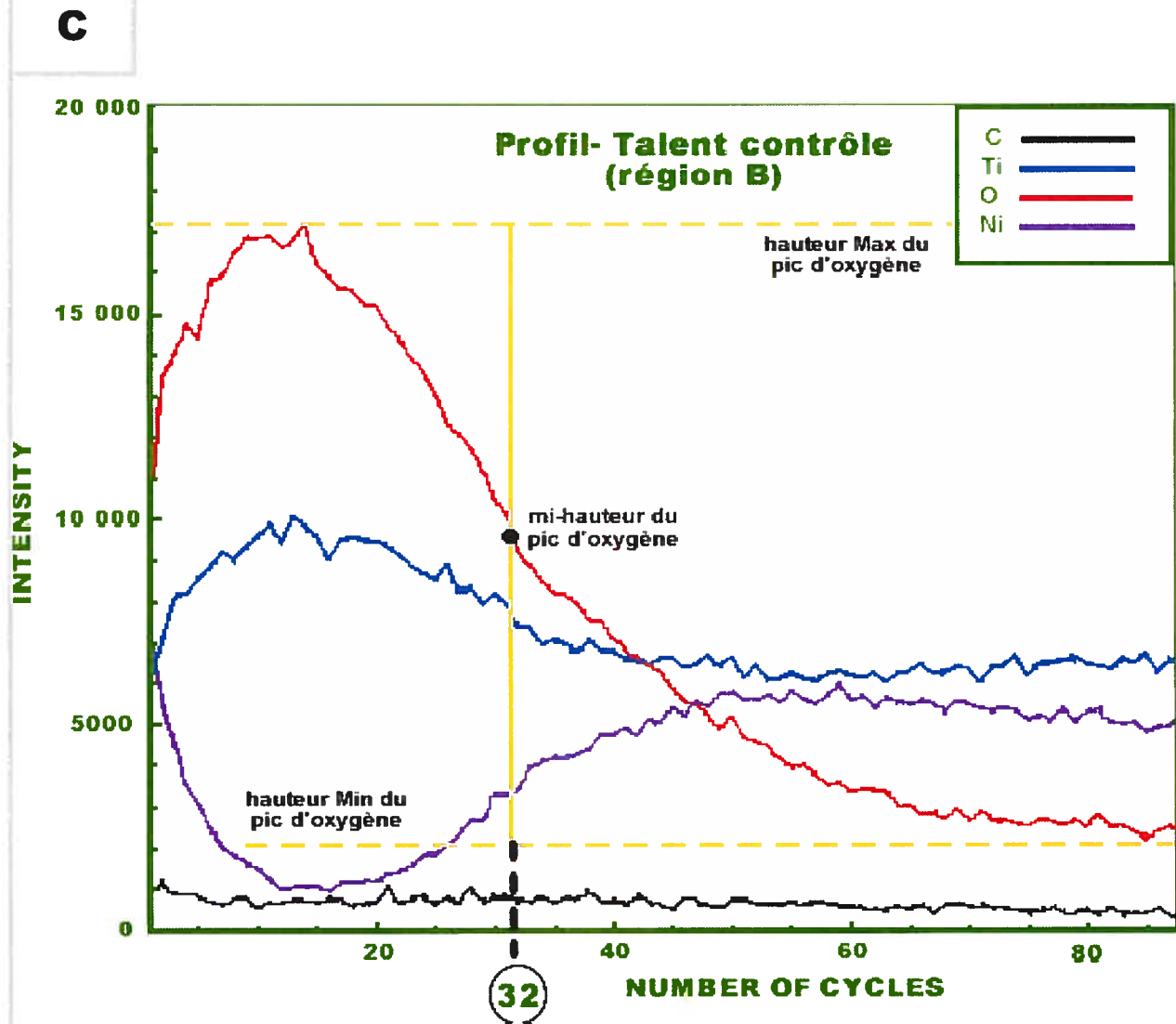
$$10 \times 9,1 = 91 \text{ sec.}$$

4) **Taux de décapage** de l'appareil

$$500\text{Å} / 91 \text{ sec} =$$

$$\underline{5,5 \text{ Å/sec}}$$

B



CALCULS

1) Temps de décapage

20 sec/cycle

3) Nombre de cycles

32 cycles

5) Épaisseur de la couche d'oxyde

640 sec. X 5,5Å/sec =

2) Taux de décapage

5,5 Å/sec

4) Nombre de secondes de décapage

32 X 20 = 640 sec

0,35 µm

Figure 16: Calculs de la couche d'oxyde de nos échantillons

A, Standard de SiO₂ et méthode de calcul utilisée pour calculer le taux de décapage (Å/s) B, spectre de survol d'un fil de nitinol d'une EC contrôle de type Talent. Il y a du Nickel à la surface de l'implant. C Profil du même échantillon et méthode de calcul utilisée pour calculer l'épaisseur de la couche d'oxyde de l'échantillon.

III-2- Vers une EC bioactive : modification de la surface des biomatériaux

Comme nous avons vu dans la revue de littérature, il existe plusieurs méthodes pour modifier ou recouvrir la surface des biomatériaux. Nous avons choisi le PPE :N pour sa riche concentration en azote qui favorise l'adhésion de plusieurs types cellulaires, tel que déjà démontré. Dans le cadre de ce projet, nous avons déposé le PPEN comme revêtement sur des films de PET et PTFE, l'avons caractérisé puis avons étudié son impact sur l'adhésion des cellules impliquées dans la guérison vasculaire (CLMV et fibroblastes), ainsi que sur les autres événements cellulaires jouant un rôle sur l'incorporation des EC (croissance cellulaire, résistance à l'apoptose, migration le long de la surface, différenciation en myofibroblastes). Les spécimens devant être stérilisés pour la culture cellulaire, une brève section explique le choix des méthodes utilisées.

III-2-1- Méthode de déposition du PPE : N

Le PPE :N a été déposé sur le PET et le PTFE en utilisant un système de déposition par plasma atmosphérique (Fig. 17). C'est l'équipe du Dr. Michel R. Wertheimer qui a procédé à la déposition du PPE :N sur nos surfaces, tout au long de nos tests. La méthode de déposition est décrite en détail dans l'article [257]. En bref, les surfaces à modifier sont placées sur une plateforme amovible en verre de 2 mm d'épaisseur qui sert principalement de barrière diélectrique. Le gaz précurseur, un mélange d'éthylène (C_2H_4) et d'azote (N_2) dans un ratio de 1 :1000, est introduit dans la zone de décharge entre l'électrode de haut voltage et la plateforme. Durant la décharge, l'échantillon est bougé dans un mouvement de va et vient pour créer un film de 75 nm d'épaisseur.

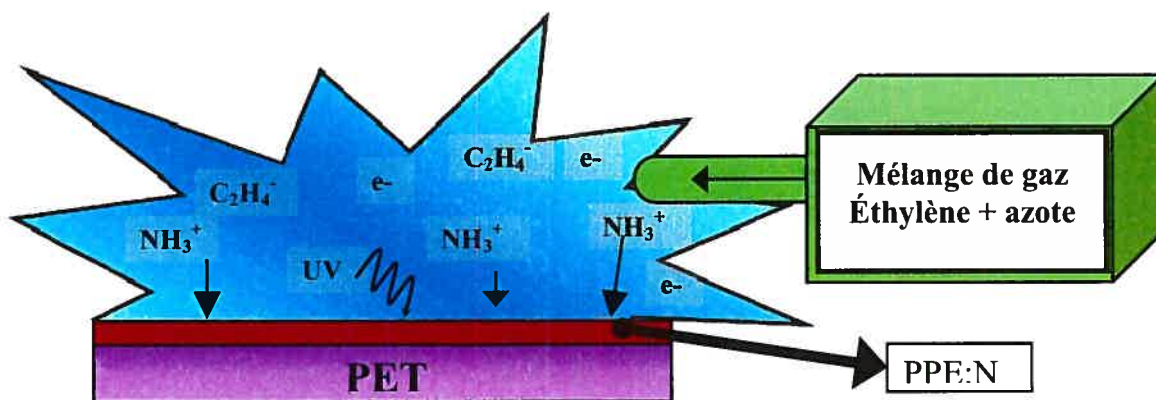


Figure 17: Système de dépôt par plasma atmosphérique

Un mélange de gaz d'éthylène et azote est mis dans la chambre où se trouve la surface à modifier. Une décharge électrique produit le plasma. Les espèces réactives modifient la surface et il y a dépôt du PPE :N à la surface.

III-2-2 Caractérisation du PPE :N

III-2-2-1- Spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS « X-ray photoelectron spectroscopy »)

La composition chimique du revêtement de PPE :N a été déterminée par XPS, par l'équipe du Dr. Wertheimer. Les analyses ont été effectuées avec un système XPS VG ESCALAB 3 MkII avec une radiation monochromatique de Mg-K α . Les spectres ont été enregistrés normalement à la surface des échantillons, pour avoir un spectre de haute résolution, l'énergie de liaison est référée au pic C1s à 285.0 eV, pour ajuster en cas de possible effet de charge. La composition du PPE:N sur le PET et le PTFE a été comparée avec le PPE :N déposé sur le verre et le polypropylène, étudié antérieurement [257].

Le but des analyses par XPS était de trouver le pourcentage d'azote et, plus particulièrement, de groupements amines dans le PPE :N déposé. Étant donné que l'hydrogène n'est pas détecté par XPS, nous avons utilisé la formule suivante pour trouver la concentration d'azote.

$$[N] = \frac{N}{N + O + C} \times 100\%$$

[N]= concentration d'azote
N= azote
O= oxygène
C= carbone

La concentration d'amine primaire [NH₂], les espèces responsables de l'adhésion cellulaire [256], a été déterminée après dérivatisation chimique en utilisant la méthode décrite par Favia et al. [260].

III-2-2-2- Angle de contact

La mesure des angles de contact est une méthode fiable pour caractériser l'interaction entre un liquide et une surface solide. Cette méthode qui a été éprouvée et établie il y a fort longtemps, a été largement approuvée par la science de la surface pour des applications extrêmement variées. L'interaction entre un liquide et une surface solide est commandée par la nature chimique de la surface, soit les premières couches atomiques. La goutte de liquide formant un angle peut être considérée comme étant en équilibre entre les trois forces impliquées. À savoir, les tensions interfaciales entre le solide et le liquide, celle entre le solide et la vapeur et celle entre le liquide et la vapeur. L'angle avec la phase liquide est connu sous le nom d'angle de contact ou d'angle de mouillage. C'est l'angle entre la tangente à la surface du liquide et la tangente à la surface du solide, à un point quelconque de leur ligne de contact (Fig. 18). L'utilisation de plusieurs liquides possédant des propriétés différentes (Tableau II), nous permet d'estimer l'énergie de la surface du matériau. Nous avons utilisé 4 liquides différents dont les différentes propriétés sont dans le tableau III-I. Nous avons utilisé la méthode de Kaelble [261] pour déterminer l'énergie

libre de la surface (γ_s) ainsi que sa composante polaire (γ_s^p) et dispersive (γ_s^d) à l'aide de l'équation suivante : $\gamma_s = \gamma_s^p + \gamma_s^d$. L'énergie de la surface est exprimée en dynes par cm_2 (dynes/ cm_2).

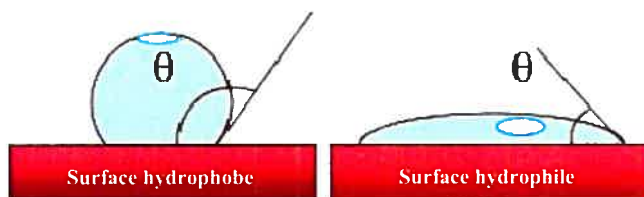


Figure 18: Représentation de l'angle de contact d'une goutte d'eau déposée sur une surface

La mesure de l'angle de contact entre la surface et la goutte permet d'estimer l'énergie de la surface, lorsque différents liquides sont utilisés.

Nous avons utilisé un goniomètre de type VCA optima 2500 (Visual Contact Angle (VCA) Optima, AST Product, Billerica, MA). La goutte déposée sur les surfaces avait un volume de 2 μl et la photo servant à calculer l'angle de contact a été prise 10 secondes après que le liquide ait été en contact avec la surface. Six mesures ont été prises pour chaque surface et chaque liquide.

Tableau II: Propriétés de différents liquides utilisés pour les mesures d'angle de contact

Liquide	γ_l (dynes/ cm_2)	γ_l^d (dynes/ cm_2)	γ_l^p (dynes/ cm_2)
Eau	72.8	21.8	51.0
Formamide	58.3	32.3	26.0
Éthylène glycol	48.3	29.3	19.0
Tricrésyl phosphate	40.9	39.2	1.7

Stérilisation

Pour effectuer des essais cellulaires sur le PET et le PTFE modifié ou vierge, il fallait que les matériaux soient stériles. Nous avons caractérisé les modifications éventuelles à la surface par la mesure de l'angle de contact. Nous avons stérilisé nos matériaux vierges (PET et PTFE) par deux méthodes, soit la stérilisation par rayons ultraviolets (UV) et par oxyde d'éthylène (OE). Nous avons ensuite évalué laquelle des deux méthodes modifiait le moins les surfaces (Fig. 19).

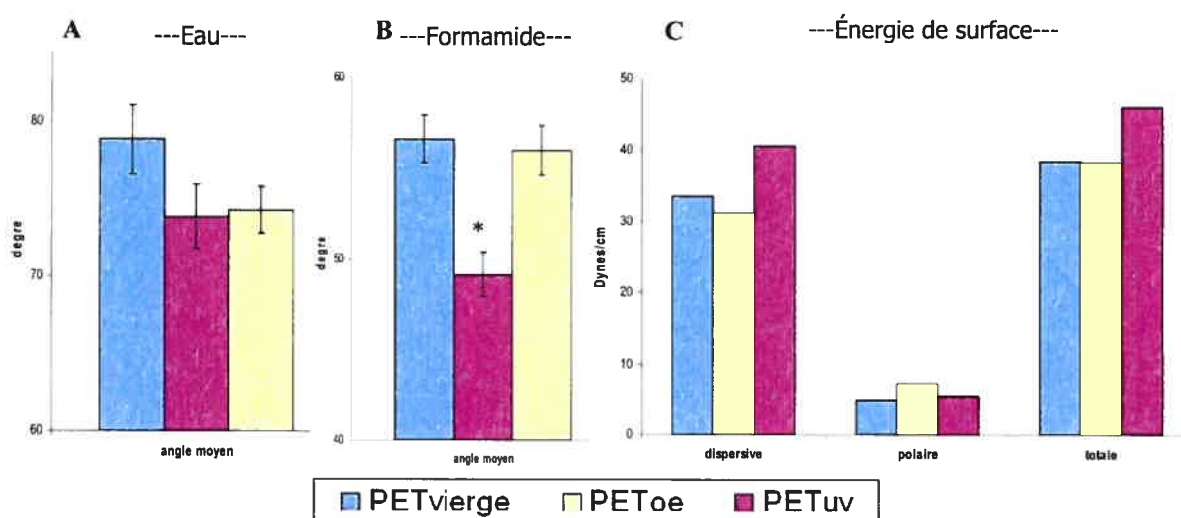


Figure 19: Effets de la stérilisation sur le PET vierge

A. angle de contact de l'eau sur le PET. Il n'y a aucune différence significative. B. angle de contact du formamide sur le PET. La stérilisation par UV diminue la valeur de l'angle de contact de manière significative C. La stérilisation par UV augmente la composante dispersive de l'énergie de la surface

Pour le PET, la stérilisation par UV modifie l'angle de contact avec le formamide et augmente la composante dispersive de la surface. La méthode de stérilisation choisie est celle par oxyde d'éthylène. Pour le PTFE, la stérilisation par oxyde d'éthylène modifie les valeurs de l'angle de contact de l'eau et diminue la composante polaire de la surface. Donc la stérilisation par rayons UV a été choisie.

III- 3- Stimulation des mécanismes cellulaires de la formation néointimale *in vitro*

Chaque protocole utilisé pour la culture cellulaire a dû être adapté pour que les tests puissent s'effectuer sur nos membranes. Les cellules devaient en effet croître sur nos biomatériaux, ce qui a nécessité quelques changements aux méthodes traditionnellement utilisées. Plusieurs mises au point des protocoles ont été nécessaires pour arriver aux méthodes finales. Les biomatériaux utilisés sont des films de PET (DuPont Teijin Films, Hopewell, VA) et de PTFE (GoodFellow, Devon, PA, épaisseur: 250µm). Pour chaque expérience, les membranes ont été coupées pour être mises dans les plaques de culture de polystyrène (PCP) de 6 ou 24 puits. Des puits vides des PCP ont servi de contrôle pour tous les tests. Deux types cellulaires ont été choisis pour faire ces tests, soient les CMLV A7R5 qui sont clonées de CMLV immortalisées provenant de l'aorte thoracique d'embryon de rat et des fibroblastes humains de tissus de poumons embryonnaires, les fibroblastes WI38. Les fibroblastes WI38 ont été utilisés entre 4 et 15 passages pour assurer leur stabilité. Tous les protocoles utilisés peuvent être consultés dans l'annexe de ce document. Les détails de chaque test sont présentés dans l'article II.

III-3-1- Essai d'adhésion

Ce test consiste à calculer la densité cellulaire sur les différentes surfaces et les comparer entre elles, en présence ou non de CS. Pour ces tests d'adhésion, nous avons utilisé des PCP de 24 puits. Les biomatériaux stérilisés ont été découpés sur une planche de verre, à l'aide d'un scalpel, d'une lame de verre et de pinces fines, tous préalablement stérilisés. Pour permettre de reproduire les tests d'adhésion d'une fois à l'autre, nous avons utilisé des cylindres de clonage (CC, « cloning cylinders ») de 10 mm de diamètre, qui nous ont permis de contrôler l'aire où les

cellules pouvaient adhérer et de maintenir les membranes dans le fond des puits. De cette manière, nous avons pu standardiser ce test et comparer les différentes surfaces en mettant un nombre de cellules constant, soit 50 000 cellules dans chaque CC. Après avoir laissé les cellules adhérer de 1 à 4 heures, celles-ci ont été colorées au cristal violet (0,75%) dans de l'acide acétique 30%. Trois photographies par puit ont été prises à un grossissement de 10X. Par la suite, le décompte des photographies en fonction de l'aire du CC a permis de calculer la densité cellulaire.

Sur le PTFE vierge, seuls des tests d'adhésion ont été effectués, puisque pratiquement aucune cellule n'adhère à la surface étant donnée sa grande hydrophobicité. Il ne valait donc pas la peine d'essayer de faire croître des cellules sur cette surface, puisqu'elles n'y adhèrent pas.

III-3-2- Test de migration

La migration cellulaire sur chaque surface a été évaluée à l'aide d'un test de cicatrisation [235] que nous avons dû adapter pour nos surfaces. Nous devions trouver quelque chose qui éviterait d'avoir des cellules dans l'endroit de migration au centre des surfaces, mais qui pourrait, le moment voulu, être retiré pour permettre la migration cellulaire. Nous avons utilisé des aiguilles stériles coupées à une longueur de 15mm, soit la largeur d'un puit d'une PCP de 24 puits (Fig. 20). Plusieurs grosseurs d'aiguilles ont été testées. Finalement, nous avons choisi des aiguilles 23G qui convenaient à l'espace de migration que nous voulions laisser aux cellules.

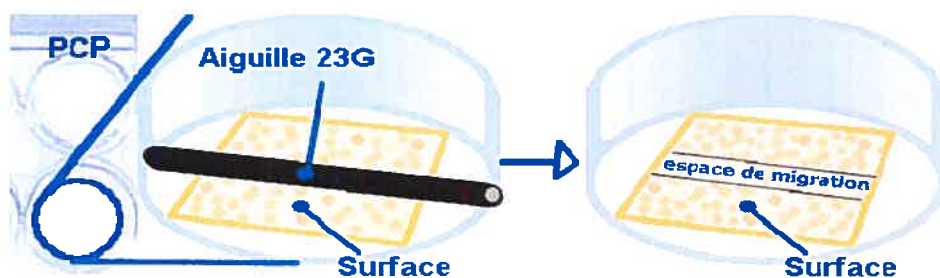


Figure 20: Schéma de la méthode utilisée pour effectuer les tests de migration

Pour les essais de migration, les cellules ont été déposées de chaque côté de l'aiguille et elles ont proliféré jusqu'à 80% de confluence. Ensuite, nous avons retiré l'aiguille et laissé les cellules migrer pendant 12 heures. Le test a été effectué sur toutes les membranes (PET +/- PPE :N, PTFE+PPEN) et sur les puits vides de la PCP, comme contrôle en milieu normal avec ou sans l'addition de CS, en solution, à des concentrations de 125, 250 ou 500 µg/ml. Quatre puits par plaque ont été colorés au temps zéro pour établir l'espace de migration. Après 12 hrs, les cellules sur les membranes ont été fixées au cristal violet et l'espace de migration a été photographié avec un microscope optique. Ensuite, à l'aide d'un logiciel (PowerPoint, Fireworks, Photoshop,...), deux lignes parallèles sont ajoutées délimitant l'espace de migration au temps zéro. Ces lignes sont ensuite transposées aux autres photographies pour délimiter l'espace de migration, et les cellules dans cet espace sont comptées. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au nombre de cellules qui ont migré dans le milieu normal.

III-3-3- Essai d'apoptose

Pour déterminer la résistance à l'apoptose des cellules adhérentes sur les différentes surfaces, les cellules ont été soumises à un milieu sans sérum (SS), connu pour induire l'apoptose. Le

pourcentage de cellules apoptotiques a alors été établi par microscopie à fluorescence ($\lambda = 360.425$ nm) sur des cellules non-fixées, non-imperméabilisées, colorées avec du Hoechst 33342 (2-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2.5'-bi-1Hbenzimidazole) (HO) et d'iodure de propidium (PI) comme décrit dans des travaux précédents [233] (technique appelée après HOPI).

Cette technique permet de différencier les cellules en apoptose et/ou en nécrose des cellules saines. Brièvement, elle consiste à ajouter du HO qui colore le noyau de toutes les cellules en bleu. Ensuite, pour prévenir la prise future de HO, les cellules sont lavées avec du PBS 1X. Le PI, qui colore le noyau des cellules en rouge, est ajouté dans une concentration finale de 5 $\mu\text{g/ml}$, juste avant l'analyse sous microscopie à fluorescence. Le PI ne colore les cellules que si l'intégrité de la membrane est compromise. Les cellules viables ont une morphologie nucléaire et cytoplasmique normales et se colorent en bleu. Les cellules en début d'apoptose sont caractérisées par un rétrécissement de la cellule, une condensation du noyau et une préservation de l'intégrité de la membrane cytoplasmique. La condensation de la chromatine est associée à une augmentation de la fluorescence du HO en un bleu très brillant, considérant que l'intégrité de la membrane empêche la coloration par le PI. Les cellules en apoptose tardive (aussi appelée nécrose secondaire) sont caractérisées par les changements nucléaires d'une cellule apoptotique, en plus de perdre leur intégrité membranaire qui permet au PI de rentrer dans la cellule. Donc, ces cellules ont une forme de petite sphère rouge, qui correspond à la fragmentation de la cellule caractéristique à l'apoptose. Les cellules en nécrose primaire sont différenciables à leur taille qui est augmentée, à l'absence de condensation de la chromatine et à la rupture de l'intégrité de la membrane qui se caractérise par de grosses cellules rouges, avec cette technique.

Pour les tests d'apoptose, les cellules adhèrent à la surface dans une goutte de 100 µl pendant 4 heures. Ensuite, 300 µl de milieu normal est rajouté et les cellules croissent sur les membranes jusqu'à confluence dans des PCP de 24 puits. Ensuite, elles sont soumises à une privation de nutriments pendant 8 hrs avec du milieu SS. De la CS, en solution, a été ajoutée à des concentrations de 125, 250 et 500 µg/ml pour évaluer son potentiel anti-apoptotique avec nos membranes.

III-3-4- Test de croissance cellulaire

Nous avons opté pour un test de croissance cellulaire, simple à réaliser étant donné le temps que nous avons. La croissance cellulaire a été établie en comptant la densité de cellules viables par surface après différents temps de culture, par la microscopie à fluorescence en utilisant la coloration par HOPI, comme décrite précédemment. En résumé, 5000 cellules ont été déposées sur le PET vierge et 10 000 cellules sur le PET+PPE :N, le PTFE+PPE :N et les puits vides de la PCP dans 200 µl de milieu normal dans des CC. Les CC ont été enlevés seulement avant la coloration des cellules puisque, comme nous avons démontré, les cellules ne sont pas affectées par les CC en milieu normal. En utilisant les CC, nous pouvons avoir une aire (mm²) équivalente dans chaque puit et ainsi pouvoir effectuer des comparaisons entre les différents matériaux et les différents temps. Après 4 hrs d'adhésion, nous avons effectué un lavage au phosphate buffer saline (PBS) 1X et changé le milieu dans chaque CC et considéré ce moment comme le temps zéro de cet essai. Les cellules ont proliféré pendant 0, 24, 48, 72, 96 et 168 hrs. Le nombre de cellules a été déterminé et exprimé en fonction du nombre initial de cellules au temps zéro qui ont adhéré. La CS n'a pas été utilisée dans ce test, puisqu'il a été démontré par le laboratoire du Dre Hébert, que la CS n'a aucun effet sur la prolifération cellulaire.

III-3-5- Test de différenciation des fibroblastes

Étant donné le rôle central du myofibroblaste dans la guérison vasculaire, nous avons regardé l'effet du PPE:N, avec ou sans l'ajout de CS, sur la différenciation cellulaire. La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes a été caractérisée par l'expression de l' α -SMA et déterminée par immunoblotting.

Les fibroblastes ont été mis sur les membranes dans une PCP de 6 puits jusqu'à confluence. Ensuite, les différentes conditions, milieu normal +/- CS 125 μ g/ml, ont été ajoutées pour 7 jours. Les cellules sur les membranes sont, par la suite, récupérées par trypsinisation. Les protéines ont été extraites à l'aide d'un tampon d'extraction (Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) + inhibiteurs) et par sonification qui brise les membranes cellulaires. Le dosage des protéines a été fait avec la trousse BCA Protein Assay Kit (BCA : bicinchoninic acid) de la compagnie Cole-Parmer. Des standards avec des concentrations croissantes d'albumine (2-100 μ g/100 μ l) ont été utilisés pour calibrer le spectromètre et les lectures ont été prises dans la lumière visible (562nm).

Ensuite, les échantillons de protéines sont déposés dans les puits du gel de migration (gel de séparation et gel de concentration) qui a été coulé dans le montage Mini PROTEAN 3 de la compagnie Bio-rad. Le montage est branché sur le générateur (40mA par gel) et les gels migrent à température ambiante. Pour le transfert sur une membrane de nitrocellulose, nous avons utilisé le système de transfert semi-dry de Biorad. Ensuite, les membranes ont été colorées au rouge de Ponso pour visualiser les bandes sur les membranes. Après, les membranes ont été bloquées avec du lait 5%, avant d'être incubées toute la nuit avec l'anticorps de l' α -SMA (dilution 1 :5000).

Le lendemain, les membranes ont été lavées au TTBS 0,05% et ensuite incubées avec l'anticorps secondaire (dilution de 1 :2000). Pour être révélées, des films sensibles à la lumière (rayon X) sont exposés aux membranes et développés. La dernière étape consistait à « stripper » les membranes pour permettre d'enlever les anticorps sur les membranes. Ainsi, nous avons pu les exposer à un autre anticorps primaire, soit la tubuline, comme contrôle de chargement de protéines de chaque puits.

CHAPITRE IV - RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

IV-1- Organisation des résultats

Ce travail de maîtrise a été effectué autour de deux thèmes majeurs. Les résultats de mon projet de maîtrise sont divisés en deux articles chacun, correspondant à l'un des objectifs de mon projet. Dans le 1^{er} article, nous reportons les résultats de l'analyse des EC explantées. Comme nous l'avons démontré, les nombreuses complications rencontrées dans l'utilisation des EC limitent leur utilisation en milieu clinique, malgré le caractère minimalement invasif de ce traitement. La première partie de ce travail consistait en l'analyse d'EC explantées pour acquérir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les cas d'échec (conversion chirurgicale) ou de réussite (autopsie). L'analyse de EC explantées provenant de cas cliniques est une source d'informations unique sur l'adaptabilité *in vivo* de ces endoprothèses. Ces résultats ont été rassemblés dans l'article I, publié en août 2006 dans le Journal of Endovascular Therapy (JEVT).

La deuxième partie de ce projet découle directement de la première. En effet, l'analyse d'EC explantées chez l'humain nous a permis de démontrer un déficit de guérison autour des EC, caractérisé par une absence de CMLV, de myofibroblastes et de formation de collagène. Le développement d'une EC bioactive qui favorise la guérison tissulaire par l'incorporation de l'implant dans la paroi, permettrait de diminuer les complications et ainsi, d'augmenter leur utilisation clinique. Dans le second article, nous présentons l'effet des stratégies choisies pour

favoriser la guérison vasculaire à la surface des greffons, soit le film de PPE:N déposé par plasma et l'utilisation de la CS comme médiateur. Leurs effets sur l'adhésion, la migration, la croissance et la résistance à l'apoptose des CMLV ainsi que sur différenciation des fibroblastes en myofibroblastes ont été évalués par des essais *in vitro* sur des films de PET et de PTFE. Ces résultats seront publiés en février 2007 dans le journal Biomaterials et constituent l'article II. Chaque article est précédé d'un avant-propos qui explique les rôles de chacun des auteurs dans les travaux présentés.

IV-2- Dégradation de l'implant et guérison inadéquate après une réparation endovasculaire des anévrismes de l'aorte abdominale : analyse d'endoprothèses couvertes explantées

Article I

Implant Degradation and Poor Healing After Endovascular Repair of Abdominal Aortic Aneurysms: An Analysis of Explanted Stent-Grafts

Publié (août 2006) dans: Journal of Endovascular Therapy (JEVT)
(**Journal of Endovascular Therapy 13 (4); 457-467, 2006**)

IV -2-1- Avant-propos: Contribution des auteurs (Article I)

Mon rôle dans cet article a été de préparer les échantillons pour les différents tests ou analyses (coupe, analyse macroscopique, photographies stéréomicroscopies,). J'ai effectué une grande partie des analyses de spectroscopie d'Auger et des coupes histologiques. J'ai aussi été impliquée dans l'écriture de l'article. Sophie Lerouge a procédé à l'analyse complète d'un cas d'autopsie (Cas #1) et elle a débuté l'analyse de quelques uns des autres spécimens. En plus, elle a participé activement à la rédaction du manuscrit et à sa structure en anglais. Les autres co-auteurs ont aussi effectué des corrections juste avant la soumission de l'article. Robert Guidoin a récupéré 9 des 12 spécimens en plus de procéder à l'analyse des dossiers. Il a servi d'intermédiaire entre notre équipe et les chirurgiens. Gilles Soulez est radiologue au CHUM et il a collaboré, grâce son expertise, dans l'analyse clinique des dossiers, comme l'observation des images des patients (CT-Scan, angiographie). Yvan Douville, Robert H. Geelkerken, Marc Sapoval, Guy Dionne et Paul Pétrasek sont les chirurgiens vasculaires qui ont fourni les explants et les informations cliniques s'y rapportant. Le système Exakt, qui nous a permis de couper nos spécimens en conservant l'interface entre les tissus et l'implant est opéré par l'équipe du Dr. Guy Cloutier. Finalement, Louis A. Gaboury nous a aidés dans l'analyse histopathologique des tissus.

IV -2-2- Manuscrit de l'article I

Implant Degradation and Poor Healing After Endovascular Repair of Abdominal Aortic Aneurysms: An Analysis of Explanted Stent-Grafts

Annie Major¹, Robert Guidoin², Ph.D., Gilles Soulez¹, M.D., Louis A. Gaboury¹, M.D., Guy Cloutier¹, Ph.D., Marc Sapoval³, M.D., Yvan Douville², M.D., Guy Dionne², M.D., Robert H. Geelkerken⁴, M.D., Paul Petrasek⁵, M.D., and Sophie Lerouge¹, Ph.D.

¹ Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montreal, Qc, Canada

² Department of Surgery, Université Laval, Quebec, Qc, Canada

³ Service de Radiologie Cardiovasculaire, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

⁴ Department of Vascular Surgery, Medische Spectrum Twente, Enschede, The Netherlands

⁵ Division of Vascular Surgery, Peter Lougheed Centre, Calgary, Al, Canada

Address correspondence and reprint requests to:

Sophie Lerouge, PhD

Laboratoire de biomatériaux endovasculaires (LBeV),

CHUM Research Center, Hopital Notre-Dame, JA de Sève Building, Y-1603,

1560 Sherbrooke St. East, Montreal, Qc, Canada H2L 4M1

Tel: (514) 890-8000 ext: 28821 ; Fax: (514) 412-7785

E-mail: [REDACTED]

Short title: Healing after AAA stent-graft repair

Abstract

Purpose: To study explanted stent-grafts to achieve a better understanding of the mechanisms of failure after endovascular treatment of abdominal aortic aneurysms (AAA).

Methods: Twelve stent-grafts were harvested at autopsy (n=3) or during surgical conversion (n=9). Device alterations were investigated by macroscopic examination, radiography, and surface analysis techniques. Healing around the implants was studied via histology and immunohistochemistry, with particular attention to the stent-graft/tissue interface.

Results: Degradation was more important with Vanguard stent-grafts (off the market) than with AneuRx and Talent stent-grafts, but rupture of nitinol wires and poor surface finish in Talent stent-grafts raise concern about their corrosion resistance and long-term stability. Poor healing was observed around stent-grafts even after several years of implantation, with absence of vascular smooth muscle cells, fibroblasts, and collagen formation. In addition to the well-known foreign body reaction around the graft, numerous polymorphonuclear cells characteristic of the first step of healing were present in tissues around stent-graft retrieved at surgical conversion. Factors explaining the lack of tissue organization around stent-grafts are discussed.

Conclusion: The long-term stability of implants remains a concern and requires more transparency from manufacturers regarding the surface properties of their devices. Lack of neointima formation impairs biological fixation of the implant to the vessel wall, leading to possible endoleaks and migration. New-generation stent-grafts promoting biological fixation should be developed to improve clinical outcomes of this minimally invasive treatment.

Key words: stent-graft, abdominal aortic aneurysm, explants, vascular healing, implant degradation, endovascular aneurysm repair, nitinol, corrosion, healing, neointima

INTRODUCTION

Endovascular aneurysm repair (EVAR) has numerous advantages over open surgery, including shorter patient recovery and hospitalization time, less blood loss, and, as recently demonstrated, lower rates of mortality/morbidity after 1 month.¹⁻³ However, efficacy is still jeopardized by several complications, including stent-graft migration^{4,5} and persistence of blood flow into the aneurysm (i.e., endoleak).⁶⁻⁸ These complications are associated with a higher risk of aneurysm rupture and call for secondary endovascular interventions, which are performed in 12% to 28% of cases.⁹

The mechanisms leading to these complications are complex and still poorly understood. Mechanical factors related to inadequate design, poor fatigue resistance, or *in vivo* degradation of the implant have been documented.^{10,11} Some studies have reported poor biological incorporation of stent-grafts into the parent vessel,^{12,13} but to our knowledge, histopathological analysis of stent-graft/tissue interface from explants has been done only on a first-generation custom-made stent-graft.¹²

Retrieval programs by manufacturers have led to the development of new-generation implants.¹⁴ However, analysis of explanted stent-grafts by independent researchers is also essential to identify the Achilles' heel of commercially manufactured stent-grafts. These data give insights into the *in vivo* adaptation of these endoprostheses to help define strategies for improving short and long-term clinical outcomes of this treatment. We report here the analysis of explanted stent-grafts harvested at autopsy or surgical conversion, and we discuss the importance of each factor as regards clinical success or failure following EVAR. Particular attention was given to the stent-graft/tissue interface.

METHODS

1. Patient Source

Twelve aortic stent-grafts explanted at autopsy (n=3) or during late surgical conversion to open repair (n=9) were included in this study, which was approved by the local institutional ethics committee. These stent-grafts had been implanted in 11 men and 1 woman (mean age 73 years, range 56–87) for the treatment of abdominal aortic aneurysms (AAA) between 1997 and 2002, with an average period of implantation of 28 months (1.5–50). The retrieved stent-grafts included 2 AneuRx (Medtronic Vascular, Santa Rosa, CA, USA), 5 Talent (Medtronic Vascular), and 5 Vanguard (Boston Scientific, Natick, MA, USA). All had nitinol structures fixed to a polyester graft with polypropylene or polyester sutures, but their design differed (Fig. 21). In 2 autopsy cases (AneuRx), patient death was unrelated to EVAR; the third stent-graft (Vanguard generation II) was obtained after occlusion of the right limb. Three surgical conversions (Tableau III) were performed after aneurysm rupture.

Specimens harvested after autopsy were retrieved en bloc, with the complete aneurysm (aneurysm sac, stent-graft, and thrombus surrounding the stent-graft), including the proximal and distal landing zone of the stent-graft in the abdominal aorta and the common iliac arteries. After retrieval, the specimens were fixed in formalin and sent to our laboratory with available clinical and *in vivo* imaging data.

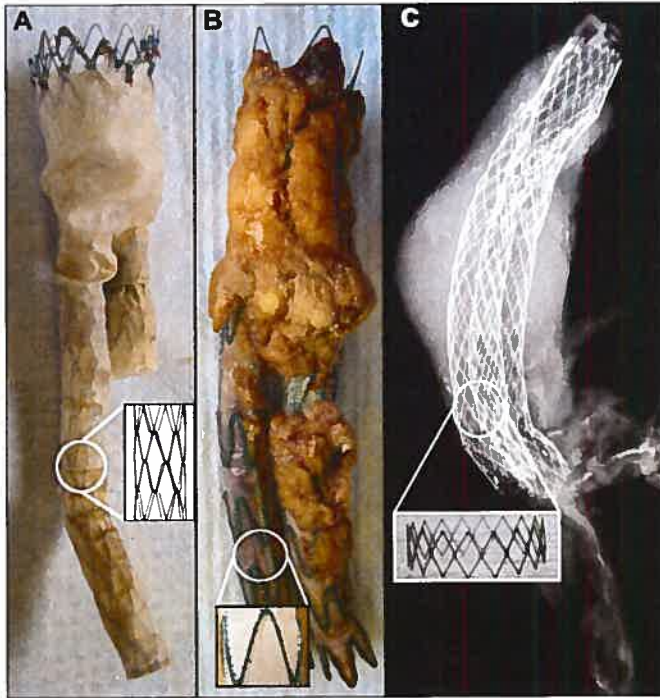


Figure 21: SG design

The 3 types of explanted stent-grafts and their macroscopic structure. **(A)** Vanguard stent-grafts were made of zigzag nitinol struts attached by polypropylene sutures and covered by a woven polyester graft. A bare stent was present at the proximal end of the implant to ensure better aortic fixation. The graft was made from yarns of microfilaments ($\phi=10\text{ }\mu\text{m}$), regularly interlaced in ends and picks to produce a continuous sheath. **(B)** Talent stent-grafts were made of a monofilament polyester fabric (Dacron LPS prepared with $40\text{-}\mu\text{m}$ -diameter filaments) fixed by polyester suture to NiTi spring wires ($\phi=500\text{ }\mu\text{m}$). NiTi wires were connected to each other by a longitudinal connecting bar, thus increasing the kinking resistance of the implant. The NiTi structure was located inside the graft at the proximal end and outside the graft at the limb. A bare stent was present at the proximal neck. **(C)** Radiograph of an AneuRx stent-graft retrieved with a complete aneurysm. AneuRx endografts had no bare stent. The polyester graft, similar to that of Vanguard devices, was supported by a square-shaped nitinol exoskeleton ($\sim 300\times 300\text{ }\mu\text{m}$).

2. Non-Destructive Testing

Specimens were submitted to non-destructive analysis, including gross evaluation of the amount, aspect, and fixation of tissues surrounding the implant. The morphology and integrity of the metallic structure, as well as the graft and sutures, were observed under stereomicroscopy. *Ex vivo* radiography was performed to examine the metallic structure of the implants and its potential alteration.

Tableau III: Clinical Data

Age, y/Sex	Device	In Situ Time, mo	Source	Cause of Death/Surgery
1. 79/M	AneuRx	1.5	Autopsy	Paralytic ileus and severe melena
2. 75/M	AneuRx	27	Autopsy	Bronchopneumonia and sepsis
3. 74/M	Talent	24	Conversion	Stent-graft infection
4. 68/M	Talent	50	Conversion	Aneurysmal degeneration of the proximal neck
5. 75/M	Talent	14	Conversion	Type I distal endoleak, followed by AAA rupture
6. 77/M	Talent	30	Conversion	Type III endoleak, AAA enlargement
7. 56/F	Talent	27	Conversion	Type I endoleak, AAA rupture
8. 76/M	Vanguard (II)	2.5	Autopsy	Occlusion of the right limb, death occurred during conversion
9. 87/M	Vanguard (I)	18	Conversion	Type II endoleak, AAA rupture
10. 76/M	Vanguard (I)	48	Conversion	Type III endoleak, limb disconnection
11. 65/M	Vanguard (I)	40	Conversion	Pulsatile AAA, limb occlusion and displacement
12. 68/M	Vanguard (II)	25	Conversion	Limb occlusion, AAA enlargement and pulsation

AAA: abdominal aortic aneurysm.

3. Destructive Testing

3.1. Histology

The Exakt cutting-grinding system (Exakt GmbH, Norderstedt, Germany) was used to prepare 1- to 2-cm-thick macroscopic sections containing the implant. Once observed and photographed, these sections were used to prepare histological slides, which included the tissue/implant interface. Tissues were dehydrated, embedded in acrylic resin (Technovit 7200; Heraeus-Kulzer, Armonk, NY, USA), cut, and polished into 30- μ m sections that were then stained with hematoxylin and eosin. Finally, the implant was carefully removed from some transverse sections to prepare conventional 3- μ m-thick paraffin-embedded slides. Masson trichrome and Von Kossa stains were used to detect collagen and calcium deposits. Gram and Periodic Acid Schiff (PAS) stains were used when infection was suspected to identify microorganisms. Immuno α -actin staining confirmed the presence of vascular smooth muscles cells (VSMC) or myofibroblasts.

3.2 Implant Surface Analysis

For surface analysis, parts of the devices were cleaned with a solution of 2% ZYMIT enzyme cleaner (Viasys Healthcare, Conshohocken, PA, USA) for 4 hours in an ultrasonic bath to remove all biological tissues. Samples were then immersed for 5 minutes in acetone and for 5 minutes in methanol before being dried. The composition and thickness of the oxide layer of the nitinol struts were evaluated by Auger electron spectroscopy (AES) using a JAMP-30 spectrograph (JEOL, Peabody, MA, USA) to record survey spectra and depth profile, respectively, at 3 locations on each sample. Nickel (Ni) content at the surface was expressed as the superficial ratio of Ni to titanium (Ti). The thickness of the oxide layer was estimated by

measuring sputtering time when oxygen reached half its maximum value. The thickness in terms of sputtering time was converted to depth units in nanometers using the sputtering rate calibrated for SiO₂.¹⁵ Specimens were gold-palladium-coated and observed by scanning electron microscopy (SEM) in backscatter mode at a 15-kV accelerating voltage (S-3500, Hitachi Canada Ltd., Mississauga, On, Canada) for detection of microscopic surface alteration. One non-implanted control sample of each stent-graft was also examined for comparison.

RESULTS

All explanted stent-grafts showed device alterations on macroscopic analysis (Tableau IV). These alterations varied from fabric tearing (Fig. 22) to broken metallic struts (Fig. 23). Rupture of numerous ligatures between zigzag nitinol struts was generally observed on the Vanguard prostheses. Rupture of several zigzag struts was noted on 2 devices. Disconnection of the modular limb from the main body of the stent-graft was apparent in 2 cases of surgical conversion. In 4 of 5 explanted Vanguard specimens, implant degradation was directly or indirectly responsible for complications leading to surgical conversion.

Talent devices were generally less damaged than Vanguard explants despite similar mean duration of implantation (27 and 29 months, respectively). However, *in vivo* implant degradation resulting in complications and surgical conversion occurred in 2 patients. AAA enlargement secondary to a hole in the fabric causing a type III endoleak was evident in the first patient (case 6, Fig. 22C). In the other (case 7), fatigue fracture of a spring wire at the proximal end (bare stent) elicited a type I leak complicated by AAA rupture 2 years after implantation (Fig. 23B,C). In another Talent device (case 3), retrieved because of infection, several broken sutures and

rupture of the nitinol longitudinal connecting bar were noted. Damage on AneuRx devices was limited to a few broken knops between metallic rings of the exoskeleton.

Tableau IV: Stent-Graft Alterations

	Device	In Situ Time, mo	Graft Perforation	Broken Struts	Broken Sutures	Involvement of Implant Degradation in Clinically-Observed Complications
1	AneuRx	1.5	0	No	>3	—
2	AneuRx	27	0	No	2	—
3	Talent	24	3	1	>10	—
4	Talent	50	1	No	5	—
5	Talent	14	0	No	No	—
6	Talent	30	1	No	4	Type III endoleak due to hole in the graft
7	Talent	27	1	1	3	Massive type I endoleak and ruptured AAA related to fracture of a nitinol wire at apex
8	Vanguard	2.5	>10	>5	>10	—
9	Vanguard	18	8	No	>10	—
10	Vanguard	48	5	No	>10	Endoleak due to limb disconnection
11	Vanguard	40	6	>5	>10	Limb disconnection
12	Vanguard	25	3	No	5	—

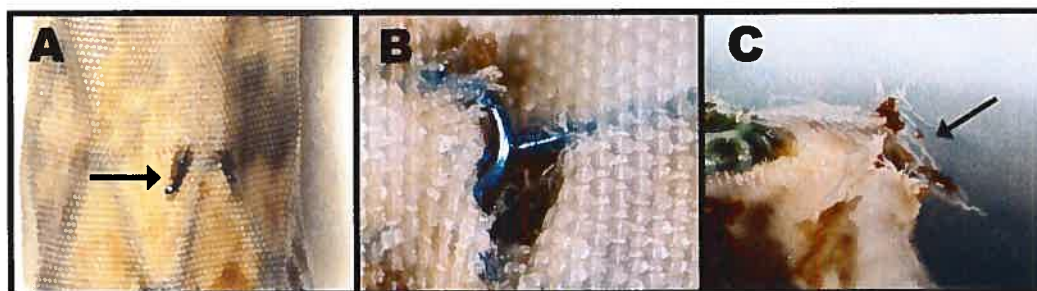


Figure 22: Fabric tearing

Graft alterations observed on explanted stent-grafts. (A) Broken struts protruded through the graft in a Vanguard specimen. Holes in a Vanguard fabric (B) and in a Talent monofilament fabric (C), which led to type III endoleaks in vivo (case 6).

Surface Analysis of the Metallic Frame

Under SEM, the nitinol struts of control and explanted AneuRx, Talent, and Vanguard devices presented numerous surface defects. Longitudinal grooves were observed on Talent stent-grafts, both explanted and control (Fig. 23D). Corrosion was visible in some areas, in particular those close to the ruptured surface of the large diameter NiTi struts on 2 Talent explants (Fig. 23C). AneuRx samples generally presented a smoother surface, except at borders where a very irregular surface was noticed.

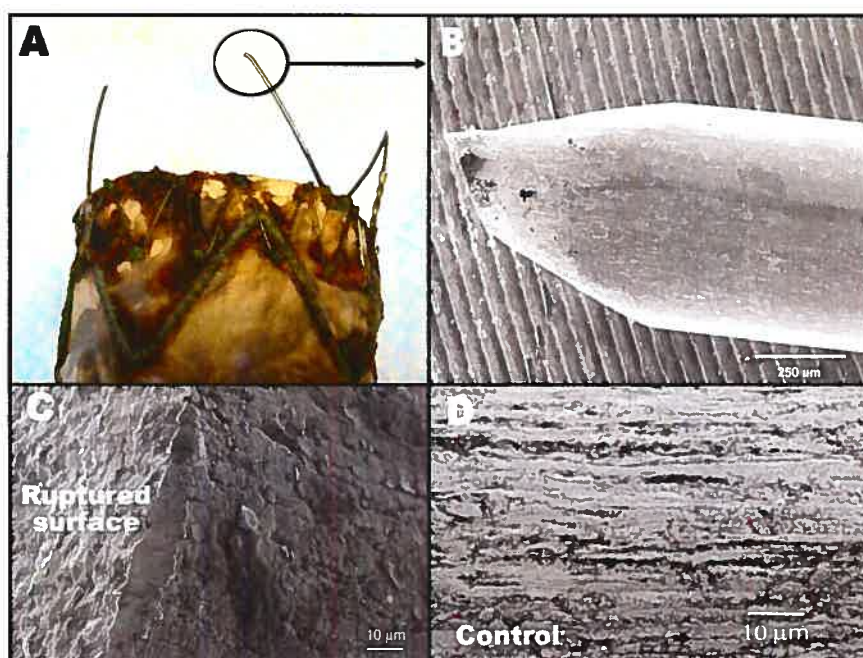


Figure 23: Talent broken metallic struts

(A,B) Fractured nitinol strut at the apex of a Talent device, which led to massive type I leak. (C) Surface close to rupture showed corrosion (SEM). (D) A control (non-implanted) Talent stent-graft also showed numerous surface irregularities (SEM).

As revealed by AES analysis, nitinol strut surfaces were composed of oxygen, titanium, nickel, and some carbon due to contamination. Surface composition was non-uniform, with some regions exhibiting high Ni content at the surface, as expressed by the high Ni/Ti ratio (Table V - 3). AneuRx and Vanguard surfaces exhibited lower Ni/Ti ratios compared to Talent explants, where the Ni/Ti ratio rose to 1 in some areas. Significant Ni content was also observed on control sample surfaces. The thickness of the oxide layer was ~200 nm for explanted Talent and Vanguard stent-grafts and only 20 nm for explanted AneuRx samples (Tableau V).

Tableau V: Thickness and Nickel/Titanium (Ni/Ti) Superficial Ratio of the Oxide Layer Covering Nitinol Struts of Each Explant and Control (determined by Auger electron spectroscopy)

	Device	Oxide Layer Thickness, μm	Ni/Ti Superficial Ratio
1	AneuRx	0.02 \pm 0.01	0.3 \pm 0.3
2	AneuRx	0.02 \pm 0.01	0.1 \pm 0.1
3	Talent	0.11 \pm 0.01	0.4 \pm 0.2
4	Talent	0.24 \pm 0.01	0.4 \pm 0.3
5	Talent	0.22 \pm 0.01	0.4 \pm 0.1
6	Talent	0.21 \pm 0.01	0.3 \pm 0.2
7	Talent	0.22 \pm 0.01	0.5 \pm 0.2
8	Vanguard	0.23 \pm 0.01	0.4 \pm 0.1
9	Vanguard	0.16 \pm 0.02	0.1 \pm 0.1
10	Vanguard	0.17 \pm 0.01	0.1 \pm 0.1
11	Vanguard	0.17 \pm 0.02	0.1 \pm 0.1
12	Vanguard	0.17 \pm 0.01	0.2 \pm 0.2
Mean Values			
	AneuRx	0.02	0.2 \pm 0.2
	Talent	0.20	0.4 \pm 0.2
	Vanguard	0.18	0.2 \pm 0.1
Non-Implanted Devices*			
	Control AneuRx	0.13	0.1 \pm 0.1
	Control Talent	0.37	0.8 \pm 0.7
	Control Vanguard	0.12	0.3 \pm 0.1

*One each; these data are given for comparison, but their significance is limited.

Healing Around SGs

All endografts harvested during surgical conversion detached very easily from the native aortic wall and surrounding thrombus. Only small amounts of tissue were adherent enough to be removed with the stent-graft and processed for Exakt histological sections. More tissue remained attached on the metallic struts than on the Dacron grafts. In general, the luminal side of the grafts was not covered completely by a thin, translucent, and friable pseudoneointimal layer ranging from 30 to 500 μm . Histological analysis (Fig. 24) disclosed that all tissue encapsulating the stent-graft was unorganized thrombus, composed mainly of fibrin and phantoms of red blood cells (RBC). Absent were VSMCs, fibroblasts, and collagen, which are necessary for biological incorporation of the textile arterial substitutes. Endothelialization was not seen on the endoluminal side of any specimen. On the other hand, inflammatory cells were quite numerous. Dacron graft fibers were lined with many multinucleated giant cells and macrophages, indicative of a foreign body reaction (Fig. 24B), as reported after implantation of polyester vascular grafts and stent-grafts.^{12,16} In addition, polymorphonuclear cells (PMN), monocytes, and macrophages were disseminated throughout the thrombus, their numbers increasing near the lumen (Fig. 24A). Interestingly, PMNs were still numerous 4 years after implantation, a sign of persistent, acute inflammation. No evidence of chronic inflammation was noted.

In 1 patient (case 3), an extensive inflammatory process related to graft infection by gram-positive bacteria was observed. PAS and gram staining confirmed the presence of large clusters of microorganisms on histological examination, and blood culture before surgical conversion was positive.



Figure 24: tissue encapsulating the SG in conversion case

Typical deficient healing observed around explanted stent-grafts (hematoxylin and eosin). (A) Immature neointima with inflammatory cells around a Talent stent-graft retrieved at 2.5 years. Myointimal cells were absent. The aneurysmal sac was filled with amorphous thrombus. (B) Grafts were lined with foreign body giant cells (white arrows). (C) Graft infolding due to oversizing was commonly seen with Talent devices.

The aneurysm walls of specimens harvested en bloc after autopsy presented features typical of medial and adventitial degeneration. At both necks, the implant was apposed to an atherosclerotic vessel wall composed of calcification, cholesterol clefts, and an acellular fibrous capsule. No sign of an organized thrombus was found around the implant, the thrombus being mainly composed of fibrin, RBCs, and a few inflammatory cells. Multilayering of dense fibrin and RBC areas into Zahn lines or circular spaces was recorded, corresponding to the successive layers of thrombus formed with time.¹⁷

Two of the 3 autopsy cases (cases 8 and 2), harvested at 2.5 and 27 months, respectively, presented deficient healing similar to the findings in failed implants retrieved at surgery. These stent-grafts were encapsulated in unorganized thrombotic material. At the proximal and distal necks, poor apposition was noticed between the implant and the atherosclerotic wall, partly due to graft infolding (Fig. 25A,B). Even when the graft was well apposed to the vessel wall, a

perigraft space of thrombotic material persisted between them (Fig. 25C). More than 2 years after implantation, no sign of stent-graft incorporation could be observed, even at the extremities of the implant.



Figure 25: tissue encapsulating the SG in autopsy case

Stent-graft design does not favor biological incorporation into the vessel wall. (A) Macroscopic view of the abrupt junction between the aortic wall and the proximal end of an AneuRx stent-graft. (B) Graft infolding, which prevents good apposition of the graft to the vessel wall, was observed on many stent-grafts, especially the AneuRx and Talent devices (hematoxylin and eosin). (C) Even when the graft was in close apposition to the atherosclerotic wall, a film of thrombotic material persisted between them (perigraft, white arrows; hematoxylin and eosin). Multinucleated giant foreign body cells lined the graft (inset).

The last necropsy specimen (case 1), harvested 6 weeks after implantation, showed a different pattern. Macroscopically, a thicker internal capsule and better stent-graft fixation into the aortic and iliac vessel walls was observed. Limited neointimal organization by myointimal cells, restricted to the luminal side, was clearly seen at the distal neck (Fig. 26). The origin of these cells (cell migration from the distal neck or circulating progenitor cells) is unknown. Endothelial cells were not evident on histology or SEM, but it should be acknowledged that they could have been removed during dissection or while processing the samples.

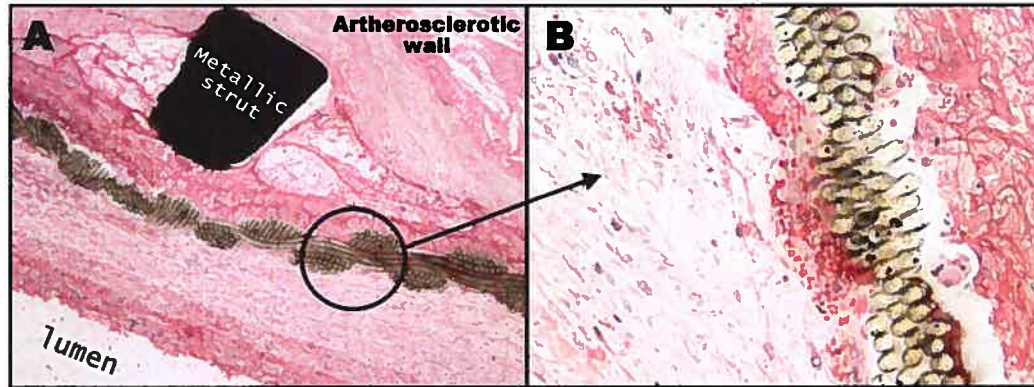


Figure 26: Beginning of neointimal organisation

(A) Beginning of neointimal organization close to the iliac distal neck in a 6-week-old implanted AneuRx device. (B)

Note that myointimal cells are restricted to the luminal side of the implant (hematoxylin and eosin).

DISCUSSION

Device-Related Complications and Failures

Severe *in vivo* alterations have been observed on first-generation implants.^{10,11,18} Since then, implants with better designs and mechanical and corrosion resistance have been developed, with increased kink resistance and structural stability. However, device-related complications and failures are still common. The extent of damage on Vanguard explants was relatively expected since this first-generation implant has been removed from the market because of lack of structural stability (see Fig. 21). The rupture of numerous ligatures between struts can lead to decreased stent-graft kinking resistance, possible strut protrusion through the fabric, and, eventually, limb occlusion as seen on several Vanguard specimens. Although it is not possible to assess its impact, the endovascular procedure itself may be implicated in alterations observed

with the Vanguard. Particularly in patient 8, from whom the stent-graft was harvested a mere 2.5 months after implantation, the numerous alterations of the device could be related to a long and difficult endovascular procedure with several stents.

AneuRx and Talent devices are still commercially available worldwide.¹⁹ In different clinical studies, they were associated with lower incidences of migration, kinking, limb occlusion, and secondary intervention compared to the Vanguard device.¹⁹ Yet, we report here 2 cases where surgical conversion was due to the failure of Talent stent-grafts. The fractures of large-diameter stent spring wires (~500- μ m diameter) observed in 2 Talent explants are not isolated cases. Thirty-four connecting bar fractures and 9 stents spring fractures have been reported worldwide on Talent stent-grafts.¹⁴ Since fatigue fractures are usually initiated at surface heterogeneities, they could be related to the surface irregularities and Ni content, which was apparent on explanted and also on non-implanted Talent devices.

Theoretically, the oxide layer covering the nitinol surface is mainly composed of titanium oxide, which confers good uniform resistance to corrosion of the alloy. All explanted stent-grafts, as well as the individual Talent and Vanguard controls we studied, also revealed significant amounts of nickel oxides in some areas. The surface composition, homogeneity, and thickness of the protective oxide layer strongly depends on industrial passivation processes, such as chemical etching or electropolishing.^{15,19,20} The differences observed between AneuRx, Talent, and Vanguard reflect the different surface treatments applied to each device. Heat-setting treatments, commonly used to predefine the shape of nitinol wires, such as Talent spring wires, have been shown to have very detrimental effects on corrosion resistance, which cannot be salvaged with subsequent surface treatments.²¹ This could explain the inhomogeneity and thickness of the

oxide layer, including the high Ni level, observed on Talent stent-grafts. To avoid further strut fractures, a new Talent device was introduced in 2003, with a modified design (medial and not lateral connecting bar) and a new passivation technique by chemical etching.¹⁴ One can only hope that these modifications have improved the corrosion resistance and endurance of Talent devices.

For obvious reasons, industrial passivation techniques of commercial devices are not in the public domain, thus limiting the surgeons' knowledge of their aspects prior to clinical use. Resistance to localized corrosion directly influences the amount of toxic Ni ions released, the risk of fracture, and long-term implant stability.²² Manufacturers should be urged to offer more information or provide samples for independent studies comparing commercially available devices. The discrepancy between the oxide layer thickness obtained on the explants and the controls, which is unlikely a consequence of implantation, highlights the difficulty of getting valid control samples produced at the same time as the explanted devices and with exactly the same processes and surface treatments.

In addition to the design and surface finish, biological factors could also influence the corrosion and *in vivo* stability of the device. The Talent device from case 3 showed severe alterations after 2 years of implantation (>10 ruptured sutures and 1 broken strut) and was retrieved due to infection. We could hypothesize that the large number of inflammatory cells releasing oxidative factors, such as free radicals, hydroperoxides, and reactive oxygen species, may have accelerated the degradation of the material, a phenomenon described as environmental stress cracking.²²

An Impaired Healing Process?

After its deployment into the aneurysm, a stent-graft is sandwiched by a thrombotic matrix. Its organization into a mature encapsulating “neointima” in continuation with the vessel wall would provide a good and permanent seal to completely exclude the aneurysm from blood flow and decrease the risks of stent-graft migration and endoleaks. Repair pathways activated after various forms of vascular injury usually lead to migration and accumulation of VSMCs and myofibroblasts derived from adventitial fibroblasts, which produce extracellular matrix components.^{23,24} When sustained chronically, this fibroproliferative process can even lead to pathological effects, such as restenosis after coronary stenting.²⁵ In contrast, neointima formation after EVAR is rather deficient.

This observation is in accord with previous studies documenting that stent-graft fixation to the vessel wall is mostly mechanical (i.e., due to radial forces exerted by the implant or fixation hooks),¹³ and biological incorporation of the first-generation stent-grafts was deficient.¹² In our study, tissues retrieved around these stent-grafts at 18, 24, or 50 months showed characteristics of the first step of healing, which normally lasts a few days or weeks. PMNs should have been replaced long since by VSMCs and fibroblasts attracted by these cells to the injury site. Their presence 4 years after implantation is a sign of persisting insult and shows that tissue organization into a mature neointima has been impaired.

The cause of deficient neointima formation is not yet clear, but several factors could be involved, including AAA physiopathology and stent-graft properties. For one, the cellular characteristics of AAA may be implicated in suboptimal neointima formation. AAA are

characterized by thinning of the tunica media and strong depletion (~75%) of VSMCs due to increased apoptosis.^{26,27} The graft is not apposed to the vessel wall in the aneurysm sac, preventing direct colonization of the graft by cells coming from the aortic wall. Cells could migrate along the implant from the proximal or distal neck or derive from circulating progenitor cells, but graft design and surface properties are not favorable to cell migration and adhesion along the implant. Dacron and expanded polytetrafluoroethylene surface properties do not promote cell adhesion.²⁸ Moreover, their low porosity seems to limit cell invasion through the graft. We and others have indeed detected very little cellular invasion of grafts in human explants or in animal models.^{12,29}

The beginning of neointima formation, observed in one specimen, was restricted to the lumen surface of the graft. Although it is not certain that further incorporation would have taken place with time, this sample may be an example of good stent-graft incorporation. The reasons for the differences noted between this case and the complete lack of biological incorporation after 2 years with a similar AneuRx stent-graft (case 2) require further investigation.

Stent-graft design and mechanical properties may also play roles in deficient healing following EVAR, as underlined by the poor apposition observed between the implant and the atherosclerotic wall at proximal and distal necks, in particular when graft infolding (commonly observed) is present.

CONCLUSION

Poor healing around stent-grafts raises concerns about the long-term outcomes of this minimally invasive procedure. The development of a new generation of stent-grafts with bioactive coating and VSMC therapy^{30,31} are promising strategies to improve healing.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Drs. J-F Blair and S. Elkouri (CHUM), Dr. C.K. Zarins (Stanford University, CA, USA), and Dr. P. Julia (Paris, France), who provided some of the explants. We also thank Zhao Qin (CHUM) for the preparation of Exakt specimens; Annie Poirier, Eric Duchenes, and Stefania Polizu (École Polytechnique de Montréal) for their help with the AES and SEM experiments; and Cindy Charbonneau for linguistic revision of this article.

REFERENCES

1. Uflacker R, Robison J. Endovascular treatment of abdominal aortic aneurysms: a review. *Eur Radiol*. 2001;11:739-753.
2. Rutherford RB, Krupski WC. Current status of open versus endovascular stent-graft repair of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2004;39:1129-1139.
3. Greenhalgh RM, Brown LC, Kwong GP, et al. Comparison of endovascular aneurysm repair with open repair in patients with abdominal aortic aneurysm (EVAR trial 1), 30-day operative mortality results: randomised controlled trial. *Lancet*. 2004;364:843-848.
4. Mohan IV, Harris PL, van Marrewijk CJ, et al. Factors and forces influencing stent-graft migration after endovascular aortic aneurysm repair. *J Endovasc Ther*. 2002;9:748-755.
5. Kalliafas S, Albertini JA, Macierewicz J, et al. Stent-graft migration after endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. *J Endovasc Ther*. 2002;9:743-747.
6. Elkouri S, Gloviczki P, McKusick MA, et al. Endovascular repair of abdominal aortic aneurysms: initial experience with 100 consecutive patients. *Mayo Clin Proc*. 2003;78:1234-1242.
7. Veith FJ, Baum RA, Ohki T, et al. Nature and significance of endoleaks and endotension: summary of opinions expressed at an international conference. *J Vasc Surg*. 2002;35:1029-1038.
8. Schurink GW, Aarts NJ, van Bockel JH. Endoleak after stent-graft treatment of abdominal aortic aneurysm: a meta analysis of clinical studies. *Br J Surg*. 1999;86:581-587.
9. Becquemin JP, Kelley L, Zubilewicz T, et al. Outcomes of secondary interventions after abdominal aortic aneurysm endovascular repair. *J Vasc Surg*. 2004;39:298-305.
10. Chakfe N, Dieval F, Riepe G, et al. Influence of the textile structure on the degradation of explanted aortic endoprostheses. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2004;27:33-41.
11. Guidoin R, Marois Y, Douville Y, et al. First-generation aortic endografts: analysis of explanted Stentor devices from the EUROSTAR registry. *J Endovasc Ther*. 2000;7:105-122.
12. Malina M, Brunkwall J, Ivancev K, et al. Endovascular healing is inadequate for fixation of Dacron stent-graft in human aortoiliac vessels. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2001;19:5-11.
13. McArthur C, Teodorescu V, Isen L, et al. Histopathological analysis of endovascular stent grafts from patients with aortic aneurysms: does healing occur? *J Vasc Surg*. 2001;33:733-738.
14. Criado FJ, Clark NS, McKendrick C, et al. Update on the Talent LPS AAA stent graft: results with "enhanced Talent." *Semin Vasc Surg*. 2003;16:158-165.
15. Thierry B, Tabrizian M, Trepanier C, et al. Effect of surface treatment and sterilization processes on the corrosion behavior of NiTi shape memory alloy. *J Biomed Mater Res*. 2000;51:685-693.

16. Sapoval MR, Gaux JC, Long AL, et al. Transient periprosthetic thickening after covered-stent implantation in the iliac artery. *AJR Am J Roentgenol.* 1995;164:1271-1273.
17. Stehbens WE. Observations on the development of mural thrombi in chronic experimental aneurysms in sheep. *Thromb Haemost.* 1997;78:952-957.
18. Riepe G, Heintz C, Kaiser E, et al. What can we learn from explanted endovascular devices? *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002;24:117-122.
19. van Marrewijk CJ, Leurs LJ, Vallabhaneni SR, et al. Risk-adjusted outcome analysis of endovascular abdominal aortic aneurysm repair in a large population: how do stent-grafts compare? *J Endovasc Ther.* 2005;12:417-429.
20. Trepanier C, Tabrizian M, Yahia LH, et al. Effect of modification of oxide layer on NiTi stent corrosion resistance. *J Biomed Mater Res.* 1998;43:433-440.
21. Lerouge S, Guidoin R, Ashton T, et al. Nitinol self-deployable prostheses: variability in corrosion resistance. *Ann Chi Sci Mat.* 2004;29:41-52.
22. Casas J, Zhao Q, Donovan M, et al. In vitro modulation of macrophage phenotype and inhibition of polymer degradation by dexamethasone in a human macrophage/Fe/stress system. *J Biomed Mater Res.* 1999;46:475-484.
23. Malik N, Francis S, Holt C, et al. Apoptosis and cell proliferation after porcine coronary angioplasty. *Circulation.* 1998;98:1657-1665.
24. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:349-363.
25. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, et al. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19:267-274.
26. Jacob T, Ascher E, Hingorani A, et al. Initial steps in the unifying theory of the pathogenesis of artery aneurysms. *J Surg Res.* 2001;101:37-43.
27. Rowe VL, Stevens SL, Reddick TT, et al. Vascular smooth muscle cell apoptosis in aneurysmal, occlusive, and normal human aortas. *J Vasc Surg.* 2000;31:567-576.
28. Callow AD. Problems in the construction of a small diameter graft. *Int Angiol.* 1988;7:246-253.
29. Lerouge S, Raymond J, Schloesser K, et al. Effect of radioactivity on stent-graft incorporation after endovascular treatment of aneurysms: an animal model. *J Biomed Mater Res.* 2006; in press.
30. Upchurch GR. Gene therapy to treat aortic aneurysms: right goal, wrong strategy. *Circulation.* 2005;112:939-940.
31. Allaire E, Muscatelli-Groux B, Guinault AM, et al. Vascular smooth muscle cell endovascular therapy stabilizes already developed aneurysms in a model of aortic injury elicited by inflammation and proteolysis. *Ann Surg.* 2004;239:417-427.

IV-3- Un revêtement riche en azote utilisé pour favoriser la guérison autour des endoprothèses couvertes après la réparation endovasculaire d'un anévrisme

Article II

Nitrogen-rich coatings for promoting healing around stent-grafts after endovascular aneurysm repair

Publié (février 2007) dans: Biomaterials
(**Biomaterials 28 (6); 1209-1217, 2007**)

IV -3-1- Avant-propos: Contribution des auteurs (Article II)

Mon rôle dans cet article a été de mettre au point tous les essais cellulaires. J'ai effectué tous les tests d'adhésion, de migration, de croissance cellulaire, de résistance à l'apoptose et de différenciation et la caractérisation par angle de contact. L'équipe du laboratoire de Marie-Josée Hébert, soit Marc-André Raymond et Patrick Laplante, m'a aidée dans élaboration des protocoles, en plus de m'aider dans mon apprentissage des différentes techniques de cultures cellulaires. Tous les essais cellulaires ont été effectués dans ce laboratoire. Sophie Lerouge a écrit le manuscrit de l'article en plus d'être responsable des travaux avec Gilles Soulez. L'équipe de Michael Wertheimer a fourni et procédé à la modification des surfaces (film de PET et de PTFE) par plasma, le PPE:N. Pierre-Luc Girard-Lauriault, en plus d'effectuer les manipulations pour déposer le PPE:N, a aussi caractérisé le PPE:N par XPS.

IV -3-2- Manuscrit de l'article II

Nitrogen-rich coatings for promoting healing around stent-grafts after endovascular aneurysm repair

Sophie Lerouge^{1,2}, Annie Major¹, Pierre-Luc Girault-Lauriault³, Marc-André Raymond¹, Patrick Laplante¹, Gilles Soulez², Fackson Mwale⁴, Michael R. Wertheimer³, Marie-Josée Hébert¹

¹ Research Center, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montréal, Qc, Canada

² Department of Radiology, Institut de Génie Biomédical, Université de Montréal, Montreal, Qc, Canada

³ Department of Engineering Physics, École Polytechnique, Montréal, Qc, Canada

⁴ Lady Davis Institute and Department of Surgery, McGill University, Montréal, Qc, Canada

Address correspondence and reprint requests to:

Sophie Lerouge, PhD

Laboratoire de biomatériaux endovasculaires (LBeV), JA de Sève Building, room Y-1603,

Hôpital Notre-Dame, 1560 Sherbrooke St. East, Montreal, Qc, Canada H2L 4M1

Tel: (514) 890-8000 ext: 28821; Fax: (514) 412-7785

E-mail: [REDACTED]

Short title: Nitrogen-rich coating for stent-graft

Abstract

Complications following endovascular aneurysm repair (EVAR) are related to deficient healing around the stent-graft (SG). New generations of SG with surface properties that foster vascular repair could overcome this limitation. Our goal was to evaluate the potential of a new nitrogen-rich plasma-polymerised biomaterial, designated PPE:N, as an external coating for polyethylene terephthalate (PET)- or polytetrafluoroethylene (PTFE)- based SGs, to promote healing around the implant. Thin PPE:N coatings were deposited on PET and PTFE films. Then, adhesion, growth, migration and resistance to apoptosis of vascular smooth muscle cells (VSMCs) and fibroblasts, as well as myofibroblast differentiation, were assessed *in vitro*. In another experimental group, chondroitin sulphate (CS), a newly-described mediator of vascular repair, was added to normal culture medium, to search for possible additional benefit. PPE:N-coatings, especially on PET, increased and accelerated cell adhesion and growth, compared with control PET and with standard polystyrene culture plates (PCP). PPE:N was also found to increase the resistance to apoptosis in VSMC, an important finding as aneurysms are characterised by VMSC depletion caused by a pro-apoptotic phenotype. Addition of CS in solution further increased migration and resistance to apoptosis. In conclusion, PPE:N-coating and/or CS could promote vascular repair around SGs following EVAR.

Key words: Aneurysm, Stent-graft, Plasma polymerisation, Chondroitin sulphate, Cell adhesion, Apoptosis

1. INTRODUCTION

In industrialized countries, where the prevalence and surgical risks of abdominal aortic aneurysms (AAA) are increasing in ageing populations[1, 2], endovascular aneurysm repair (EVAR) with a stent-graft (SG) prosthesis offers a promising, less invasive alternative to open surgery. Its widespread use is, however, limited by frequent complications such as SG migration [3, 4] and persistence of blood flow into the aneurysm (i.e. endoleaks)[5-7]. Recently, two large randomised studies comparing EVAR with open repair showed that despite a gain in peri-operative morbidity and mortality in the EVAR group, there was no difference in mid-term mortality between both groups and more reinterventions were observed in the EVAR group [8, 9]. Mounting evidence suggests that complications are related to deficient healing around SGs. Even several years after implantation, SGs were found to be surrounded by amorphous, unorganized thrombus composed mainly of a fibrin matrix and phantoms of red blood cells, and characterised by a strong deficit in vascular smooth muscle cells (VSMC), myofibroblasts and collagenous extracellular matrix (ECM)[10-12]. The lack of vascular cell ingrowth into the graft material limits its fixation to the vessel wall and prevents a good seal at the neck of the aneurysm. More generally, it raises concern about the long-term outcome of this treatment.

Pathophysiology of AAA and surface properties of SGs are two major factors that can explain deficient healing around SGs. SGs consist of a metallic structure covered by a fabric of woven poly(ethylene terephthalate) fibers (PET, Dacron ®) or by expanded polytetrafluoro-ethylene (ePTFE). These two biomaterials have a long clinical history as vascular implants thanks to their relatively low thrombogenicity and good mechanical properties, but they are not optimal for SG incorporation. The hydrophobic surface of ePTFE is known to drastically limit cell adhesion

[13]. Dacron^R grafts are less inert, and have been shown to result in slightly improved but still insufficient incorporation [14]. Moreover, the aneurysm wall is characterized by a strong depletion of VSMC, related to increased apoptosis[15, 16]. Development of an external coating that can enhance cell adhesion, proliferation, migration and resistance to apoptosis should help to increase SG biological fixation into the aneurysm and improve the outcome of this minimally invasive procedure.

We have recently developed a novel plasma-polymerised thin film coating that is extremely rich in nitrogen (hereafter called "PPE:N", or N-doped plasma-polymerised ethylene), which increases the adhesion of different cell types [17]. The principal objective of this study was to explore the potential of this new biomaterial as an external coating for PET- or PTFE- based SGs to improve healing around the implant.

Chondroitin sulphate (CS) has recently been identified among cryptic bioactive factors released by ECM proteolysis which foster a fibroproliferative reaction during normal vascular repair [18]. CS increases resistance to apoptosis of VMSC and fibroblasts and promotes fibroblast differentiation into a contractile phenotype *in vitro* [18, 19]. Hence, this readily available polysaccharide could be incorporated into a bioactive coating to foster further SG incorporation. Therefore, the second objective of this study was to explore the potential of CS to add further benefit to the PPE:N coating in promoting a fibro-proliferative reaction *in vitro*.

PPE:N coatings were deposited onto thin commercial PET and PTFE films; physico-chemical characterizations of the same coatings deposited on glass were carried out using complementary techniques including attenuated total reflectance (ATR) FT-IR, X-ray photoelectron

spectroscopy (XPS, including with chemical derivatization), contact angle goniometry, atomic force microscopy (AFM), and ellipsometry. Since these were already reported elsewhere [17], we shall briefly summarize them in the Discussion section only. In the present work, surface characterization was limited to XPS and to contact angle measurements, in order to assess possible differences between coatings on the current substrates with those previously deposited on glass or on polypropylene [17]. The effect of PPE:N coatings was evaluated *in vitro* on VSMC and fibroblasts, the two major cell types implicated in vascular repair. Cell adhesion, growth and resistance to apoptosis, as well as myofibroblast differentiation were assessed in normal media with or without the addition of CS in solution.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plasma polymer deposition

PET and PTFE films were obtained from DuPont Teijin Films (Hopewell, VA) and from GoodFellow (Devon, PA), respectively. PPE:N coatings were deposited on both films using an atmospheric pressure plasma deposition system described elsewhere [17]. Briefly, this system comprises a cylindrical, dielectric-coated stainless steel high voltage (HV) electrode and a grounded planar Al electrode, covered by a 2 mm thick glass plate that serves as a second dielectric layer. The entire apparatus is placed inside a transparent plastic enclosure containing the controlled gas atmosphere at a pressure of 1 bar. The PET or PTFE film samples were placed on the glass plate, which was moved under the HV electrode at precisely controlled speed. The precursor gas mixture composed of nitrogen (N_2 , 10 standard liters per minute, (slm) and

ethylene (C_2H_4 , 10 standard cubic centimeters per minute, sccm) was introduced into the discharge zone, an adjustable gap between the HV electrode and the glass plate, usually 1 mm. The discharge duration was selected so as to create a 75nm-thick coating. PET and PTFE films were sterilized using ethylene oxide and ultra-violet (UV) irradiation, respectively, prior to PPE:N film deposition. These sterilization methods were chosen since they induce minimal surface modification, as assessed by contact angle measurements described below. After plasma coating, specimens were still sterile since plasma discharges are known for their bactericidal effect [20].

2.2. Film characterisation

The elemental compositions of PPE:N films were determined by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), using a Kratos Axis Ultra system with non-monochromatic Mg-K α radiation. The spectra were acquired normal to the sample surface; survey spectra were used to determine the relative nitrogen concentration, [N] (expressed as the percentage of N with respect to the sum of all detected elements, excluding hydrogen, which is not detected by XPS). PPE:N compositions on PET and PTFE were compared to those of coatings deposited on glass and propylene surfaces [17].

The wettability of PET and PTFE before and after PPE:N coating was evaluated by static contact angle measurements (Visual Contact Angle (VCA) Optima, AST Products, Billerica, MA). The surface free energy, γ_s , and its polar (γ_s^p) and dispersive (γ_s^d) components were calculated after multiple ($n \geq 4$) measurements of contact angles with water, formamide, ethylene glycol and tricresyl phosphate (TCP), according to the method described by Kaelble [21]. Contact angle

measurements were also used to assess possible surface damage induced on the films by sterilization.

2.3. Cell lines and materials

A7R5 cells, a clonal smooth muscle cell (VSMC) line from rat embryonic thoracic aorta (ATCC, Manassas, VA) were cultured in DMEM/F12 supplemented. WI-38 human fibroblasts from normal embryonic lung tissue (ATCC, Rockville, MD) were grown in Fibroblast Basal Medium (Cambrex, Walkersville, MD), and used at passages 4-15. Culture medium was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; MEDICORP, Quebec, Canada) and 1% penicillin-streptomycin (GibcoBRL, Invitrogen, Grand Island, NY). For each experiment, coated and control films were cut to fit into 6- or 24-well polystyrene culture plates (PCP). PCP surfaces (Costar®, Corning Life Sciences, Acton, MA) commonly used for cell culture served as a positive control in each test. Chondroitin 4-sulphate was acquired from Calbiochem (San Diego, CA, US).

2.4. Cell adhesion, apoptosis, growth, migration and differentiation assays

Cell adhesion after 1 to 4 hours of culture on the different film surfaces was determined using crystal violet staining [18], as detailed below. One square cm film samples were placed at the bottoms of 24-well PCP; their floatation to the surface was prevented by a cloning cylinder (Fisher, Pittsburgh, PA) of 10 mm diameter and height. This also allowed controlling the surface area where cells could adhere, and thereby rendered the tests reproducible. Cells were seeded in the cloning cylinder in 200 µl of normal medium and left to adhere for 1 to 4 hours at

37°C in an incubator with 5% CO₂. Films were then washed twice in PBS to remove non-adherent cells; 50 µl of 0.75% crystal violet/30% acetic acid was added to 500 µl of PBS for 15 min. Films were then washed and allowed to dry. Three micrographs at 400X magnification were taken by light microscopy for each sample; the numbers of adherent cells were counted on each micrograph by a single investigator blinded to experimental conditions

Resistance to apoptosis of VSMC adhered on coated films was compared to that of cells adhered on unmodified films and PCP. Apoptosis was induced by serum starvation and was assessed using fluorescence microscopy of unfixed/unpermeabilized cells stained with Hoechst 33342 (2'-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2.5'-bi-1*H*-benzimidazole (HT)) and propidium iodide (PI), as described in our previous work [19, 22]. This technique was shown to accurately differentiate early apoptotic, late apoptotic, and primary necrotic cells, and it is more accurate for the evaluation of apoptosis than TUNEL assays [23]. Briefly, cells were left to adhere and grow to confluence on films in 24-well PCP. Apoptosis was induced by serum starvation for 4, 8, 16 or 24 hours. HT (1 µg/ml) was added for 10 min at 37°C. To prevent further uptake of HT, cells were washed with PBS. PI was added to each sample to a final concentration of 5 µg/ml, immediately before analysis by fluorescence microscopy (excitation filter $\lambda = 360.4$ nm). The percentages of normal, apoptotic, and necrotic cells adherent to each sample surface were calculated based on three areas of observation, at a magnification of 200X. To evaluate the impact of CS on VSMC apoptosis on the various surfaces, CS was added to the serum-free medium at a concentration of 0, 125, 250 or 500 µg/ml ($n \geq 4$) [18]. Experiments with 8h serum starvation were performed in triplicate.

To compare cell growth on the various surfaces, VSMC were added within the cloning cylinder placed on film samples and left to adhere during 4 hours. To counterbalance the lower degree of cell adhesion on virgin surfaces (see Results section) and to obtain comparable numbers of adherent cells on each surface after 4 hours, 10,000 cells were added in wells containing the virgin films, but only 5,000 cells on coated film samples. After 4 hours, media were changed to remove non-adherent cells (henceforth designated " t_0 "). Cells were then allowed to grow for 0, 2, 4 and 7 days. Cell numbers at each time point were evaluated on 6 wells for each type of surface by HT-PI staining, according to the apoptosis protocol described above. Data were expressed as the percentage of initial cell numbers (at t_0) on a similar surface.

Cell migration on each surface, with and without CS, was evaluated with an adapted wound assay [24]: Cells were grown to near confluence on both control and PPE:N-coated film samples at the bottom of 24-well plates, in the centre of which a 23G stainless steel needle (BD-Canada, Oakville, ON) had been placed horizontally. The needle was then gently removed, leaving a 0.5 mm-wide space free of cells. Cells were then left to migrate for 12 hours in normal serum, with or without the addition of CS at concentrations of 125, 250 or 500 $\mu\text{g/ml}$. Cells were washed and stained with crystal violet, as described above. Migration was assessed using light microscopy at a magnification of 100 X. Migration was defined as the ratio of (numbers of cells present in the partially denuded experimental area over the number of cells present in the initially denuded control area) $\times 100$. Three fields per well were evaluated, and experiments were done in duplicate.

Myofibroblast differentiation, as characterized by expression of alpha-SMA, was assessed by immunoblotting. Fibroblasts were plated on virgin and coated film samples at the bottom of 6-

well PCPs and allowed to reach confluence. They were then kept in normal culture medium (changed every other day) for 7 days and retrieved by trypsinization. Proteins were extracted, separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and probed as we previously described [19]. The antibody used was anti- α -smooth muscle actin (anti- α -SMA; Sigma, St. Louis, MO). All membranes were stripped (2 % SDS, 100 mM β -mercaptoethanol and 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7) at 50°C for 30 min. by gentle shaking, then reprobed with anti- α -tubulin monoclonal antibody (Oncogene, Boston, MA) as a control for protein loading.

2.5. Statistical analyses

Results are expressed as mean values \pm standard deviation (SD). Data were analysed using Student t-tests or multivariate ANOVA, as appropriate. A p value of 0.05 or less was considered significant.

3. RESULTS

3.1. Coating characterization

As expected, PPE:N coatings possessed high nitrogen contents ($[N] \sim 32\%$), as determined by XPS analysis (Tableau VI), values on PET being similar to those on glass and polypropylene substrates used in previous work [17]. On PTFE, however, the first set of experiments revealed about 8% F content (see Tableau VI). This may be due to some uncoated regions or to volatilized F incorporated into the coating during plasma deposition, or possibly to a combination of both. To avoid this, surface pre-treatment of the PTFE with nitrogen plasma was performed prior to PPE:N deposition which yielded surfaces with elemental compositions close to those of coated PET and glass, except for a small amount of F (Tableau VI, PTFE 2nd set of experiments). The measured elemental concentrations of virgin PET and PTFE differ slightly from those expected from the molecular formula of the polymers (71.5 % and 33.5 % carbon for PET and PTFE respectively). This disparity is due to unavoidable contamination of the surface by atmospheric hydrocarbons.

Tableau VI: Relative elemental compositions, determined from XPS survey spectra (atomic %)

Elemental Composition (at %)	C	N	O	F
Virgin PET	79	0	21	0
Virgin PTFE	36	0	0	64
PPE:N- coated PET	65	32	3	0
PPE:N- coated PTFE (first set)	58	25	9	8
PPE:N- coated PTFE (second set) ^a	69	29	1,5	0,5

^a Deposition following surface pre-treatment with N₂ plasma.

Contact angle measurements showed that the PPE:N-coated surfaces exhibit substantially increased wettability (reduced contact angles), especially in the case of the strongly hydrophobic PTFE surface (Fig. 27). The films' surface energies, γ_s , indicative of their wettability by aqueous media, was found to increase from 38 or 25 mN/m (or dynes/cm) for virgin PET and PTFE, respectively, to about 56 mN/m for the PPE:N-coated surfaces, the same value reported previously for PPE:N-coated glass [17]. While coated PET and PTFE exhibit similar average wettabilities, a higher standard deviation was observed for the coated PTFE. This can be explained by the presence of some areas on the samples having contact angles close to 80° and confirms the inhomogeneity of the coating on this substrate.

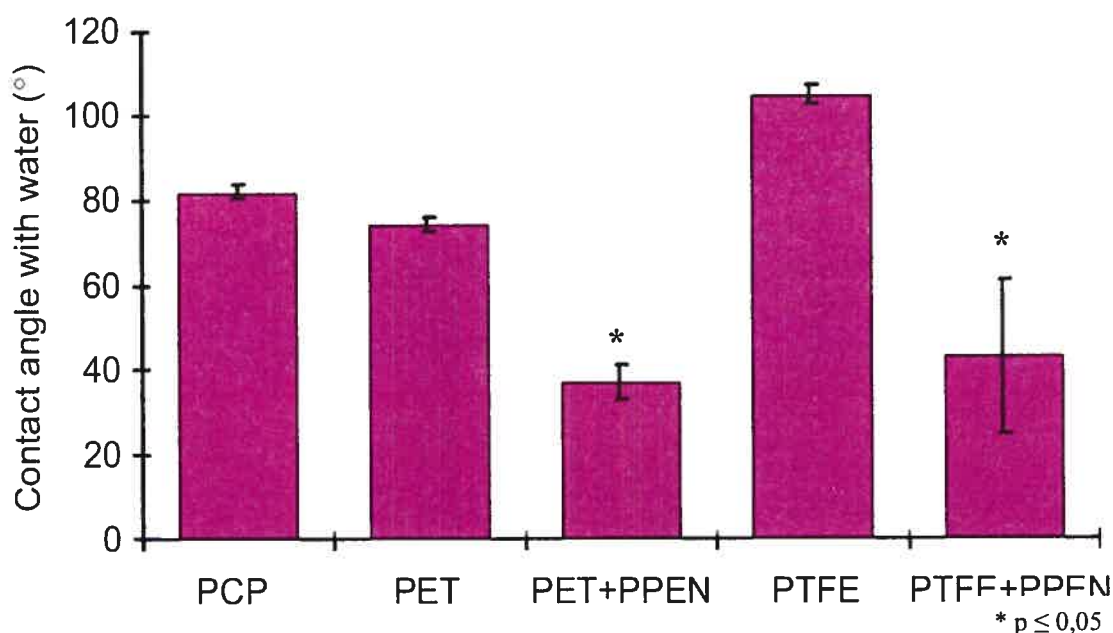


Figure 27: Values of water contact angle for control and PPE:N coated surfaces

Values of water contact angle for control and PPE:N-coated PET and PTFE surfaces, in comparison with polystyrene culture plates (PCP) (mean +SD)

3.2. Cell adhesion, apoptosis, growth, migration and differentiation

Cell adhesion on the surface is the first cellular event required to promote a strong biological fixation of the SG. PPE:N coatings do increase the adhesion and adhesion rate of VSMC and fibroblasts compared to untreated control surfaces ($p < 0.001$), as well as to PCP, as shown in Figures. 28 and 29. Virtually no adhesion is seen to have occurred on untreated PTFE films (thus, other biological endpoints could not be tested on these surfaces). In contrast, PPE:N-coated-PTFE was covered with VSMCs. PPE:N-coated PET gave even higher cell density ($p = 0.05$).

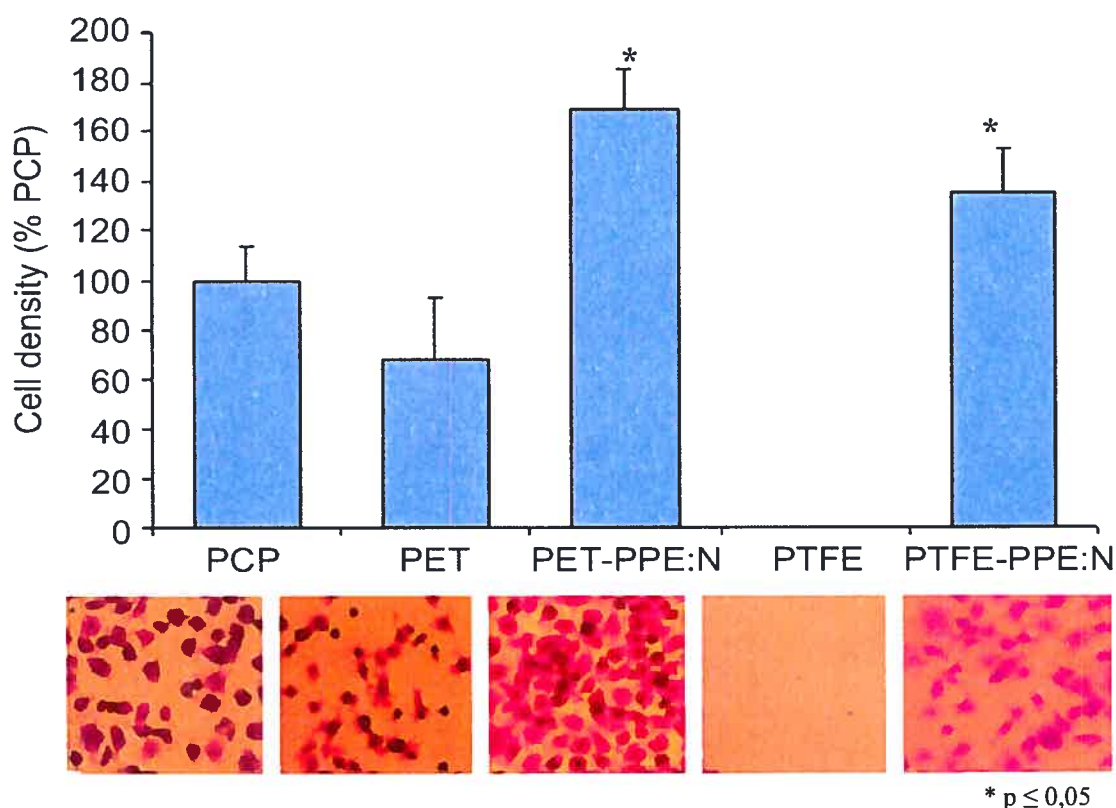


Figure 28: VSMC adhesion at 1 hour

VSMC adhesion at 1 hour on PCP, control and coated PET and PTFE films : the cell density is expressed as the percentage comparatively to cell density on PCP surfaces. Most cells expressed a rounded morphology on PCP and virgin PET while cell spreading is observed on coated films. Results are represented as mean and standard deviation

The adhesion rate was higher on coated PET: adhesion reached the maximal level after 1 hour on coated PET whereas the number of adherent cells was still increasing between 1 and 4 hours on virgin PET (Fig. 29). Differences between the two surface were still significant after 4 hours ($p > 0.05$). While after 1 hour most VSMCs exhibited a rounded morphology on control PET, cell spreading was observed on the PPE:N-coated PET (fig. 28). Similar behaviour was also observed in the case of fibroblasts (Fig. 29b).

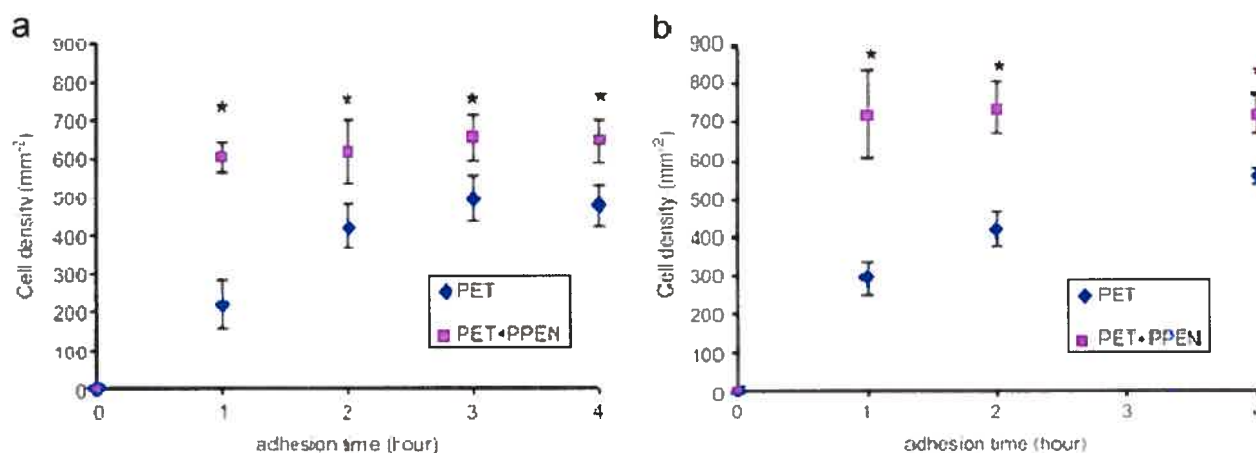


Figure 29: Adhesion kinetics of VSMC and fibroblast

Rate of adhesion of VSMC (a) and fibroblasts (b) on PPE:N-coated and control PET films, expressed as densities of cells on the surfaces after 1, 2, 3 and 4 hours of incubation. (* $p < 0.001$ $n=6$)

Cell growth was enhanced on PPE:N-coated PET compared to all other surfaces, including PCP. Difference was already significant after 48h (Fig. 30). After 7 days, cell growth on control PET was significantly lower than on the other three materials ($p < 0.05$).

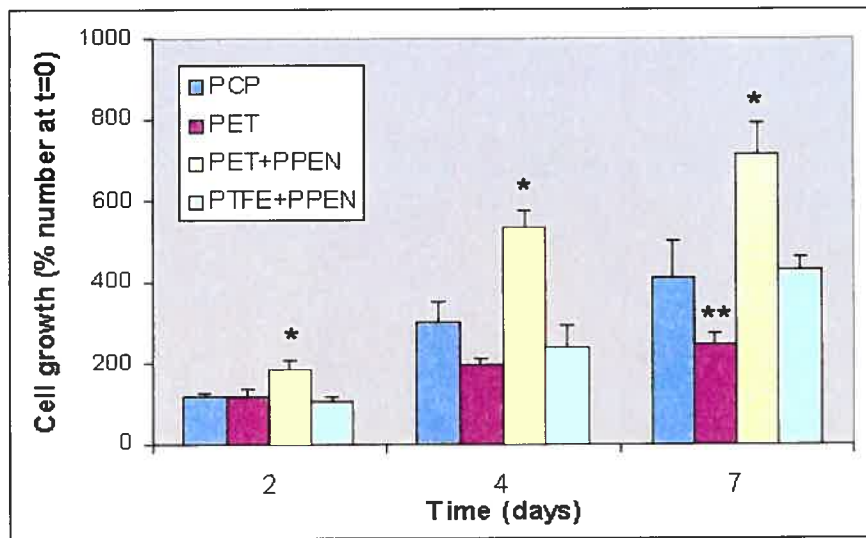


Figure 30: Cell growth assay

Cell growth on PPE:N-coated films, compared to that on virgin PET and on PCP. Cell densities are expressed as a percentage with respect to those observed at t_0 (4 hours of culture) for each surface (* PET+PPE:N is significantly higher than all for other surfaces ($p < 0.05$); ** PET is significantly lower than for all other surfaces ($p < 0.05$))

Regarding resistance to apoptosis, VSMC cultured in the presence of normal FBS-containing medium displayed a higher rate of apoptosis when grown on PET films as compared with PCP ($5.8 \pm 2.9\%$ versus $2.3 \pm 1.0\%$, $p < 0.05$). No difference was found between PCP and PET-PPE:N ($2.3 \pm 1.0\%$ versus $2.5 \pm 0.4\%$, $p = 0.95$, Fig. 31a). As availability of growth factors may be limited in the abluminal side of the SG, which will not be in direct contact with flowing blood, we evaluated apoptosis levels of VSMC grown on the various surfaces and exposed to serum-free (SS) medium. The percentages of apoptotic VSMC increased drastically when exposed to SS for 8 hours, especially for the case of control PET ($35.4 \pm 4.0\%$), but to a lesser extent on PPE:N coatings ($16.4 \pm 2.2\%$), even though the latter was still significantly higher than on PCP (significant differences were found between all groups ($p < 0.001$)). Less benefit was found in the case of PPE:N-coated PTFE, on which cells in normal or serum-free-medium showed significantly higher apoptosis than those on the coated PET surfaces ($p < 0.001$).

On each surface, incidence of apoptosis was significantly reduced when VSMCs were exposed to SS containing CS compared with SS alone (Fig. 31b) As illustrated in Fig. V-12c, addition of CS resulted in additional increase in resistance to apoptosis on PPE:N-coated PET. The percentage of apoptotic VSMCs remained around 10% after up to 24 hours in SS, a level close or even below that observed on PCP surfaces (Fig. 31c).

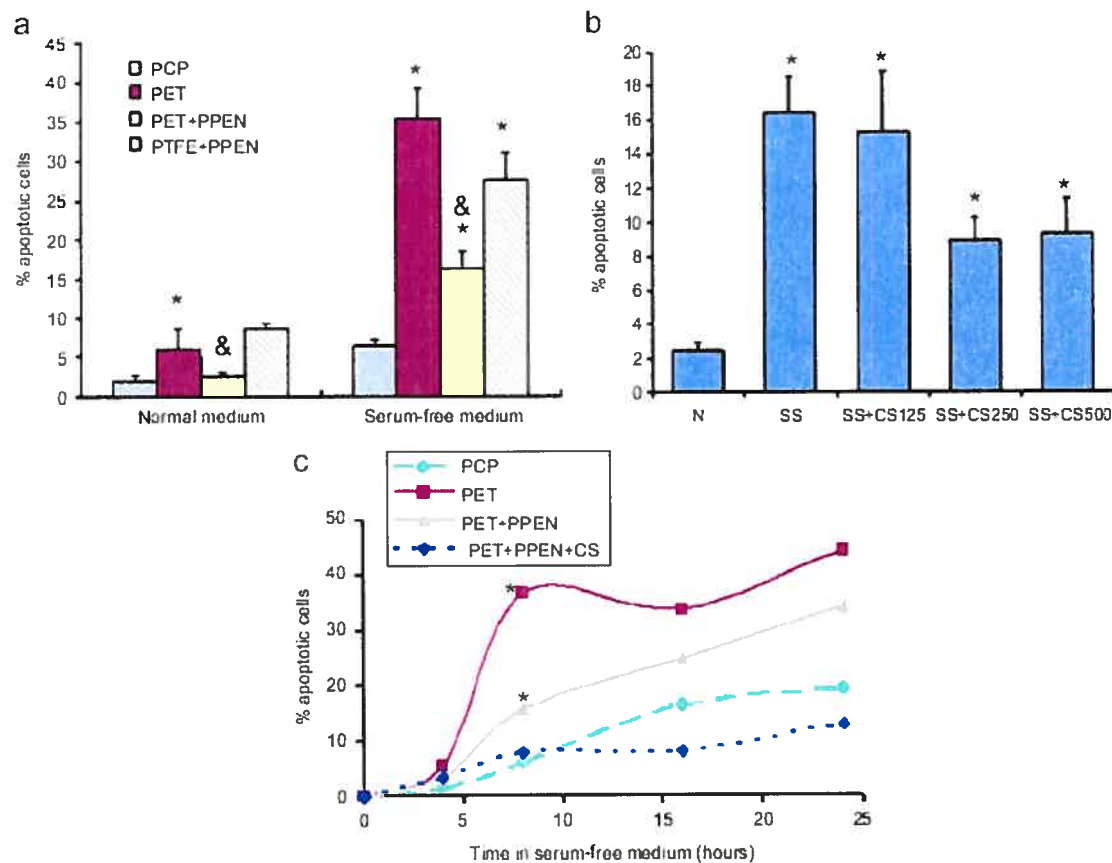


Figure 31: Result of resistance to apoptosis in VSMC

(a) Percentages of apoptotic VSMCs grown on different surfaces in normal and serum-free media for 8 hours. (* significantly different than PCP ($p < 0.05$); & significantly Nitrogen-rich coatings for SGs – page 20 different than PET ($p < 0.01$); (b) CS dose dependence of VMSC apoptosis (* : $p < 0.01$) for the case of PPE:N-coated PET; (c) Percentages of apoptotic VSMCs after 4, 8, 16, and 24 hours in serum-free media (PPEN-PET +CS : VSMC apoptosis on PPE:N in SS with addition of 250 $\mu\text{g/ml}$ CS. Since experiments at 4, 16 and 24 hours were not performed in duplicate, statistical analysis was here only performed for the time point at 8hours * $p < 0.05$).

Cell migration is a highly integrated multistep process that contributes to tissue repair and regeneration [25]. VSMC migration from the aneurysmal neck on a SG implant surface would constitute an important factor towards achieving neointima formation and healing along the implant, not only at the necks of the aneurysm. Here, we have evaluated whether PPE:N coatings can increase VSMC migration on the surface, using an adapted *in vitro* wound assay. PPE:N coating and the addition of CS were both found to lead to significantly increased migration on PET films ($p < 0.0001$) (Fig. 32), the best results being obtained when PPE:N coating and 500 $\mu\text{g/ml}$ of CS are combined ($p < 0.0001$).

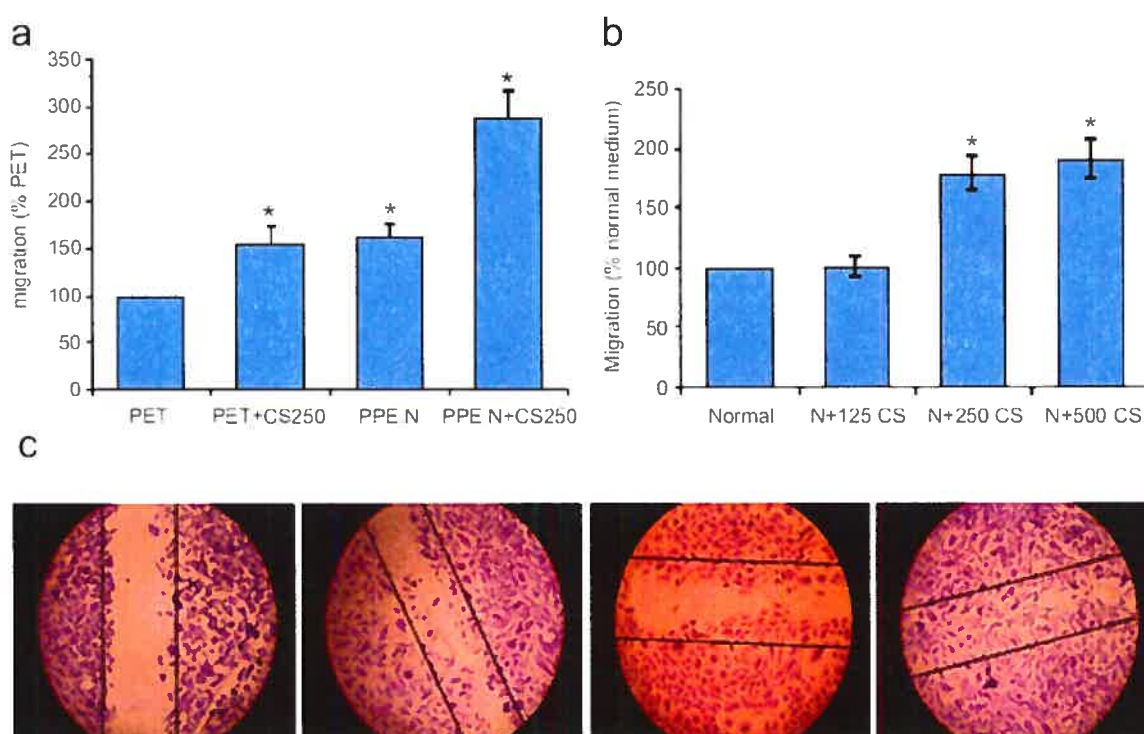


Figure 32: Migration of VSMC

(a) Migration of VSMC after 12 h in normal medium on PET or PET-PPEN surfaces, with or without the presence of CS (250 $\mu\text{g/ml}$); (b) Migration of VSMC on PPE:N-coated PET, with addition of CS (125, 250 or 500 $\mu\text{g/ml}$); (c) Micrographs illustrating migrations under the various conditions indicated.

Finally, as myofibroblasts are essential to wound closure during normal repair and are also implicated in tissue contraction [26], we have investigated whether PET, PPE:N coatings and CS mediators can regulate fibroblast differentiation. Fibroblasts exposed either to PPE:N-coated surfaces or to CS in normal medium for 7 days showed increased protein levels of α -SMA compared with cells on PET and PCP (Fig. 33). No further increase was observed when PPE :N was combined with CS in solution.

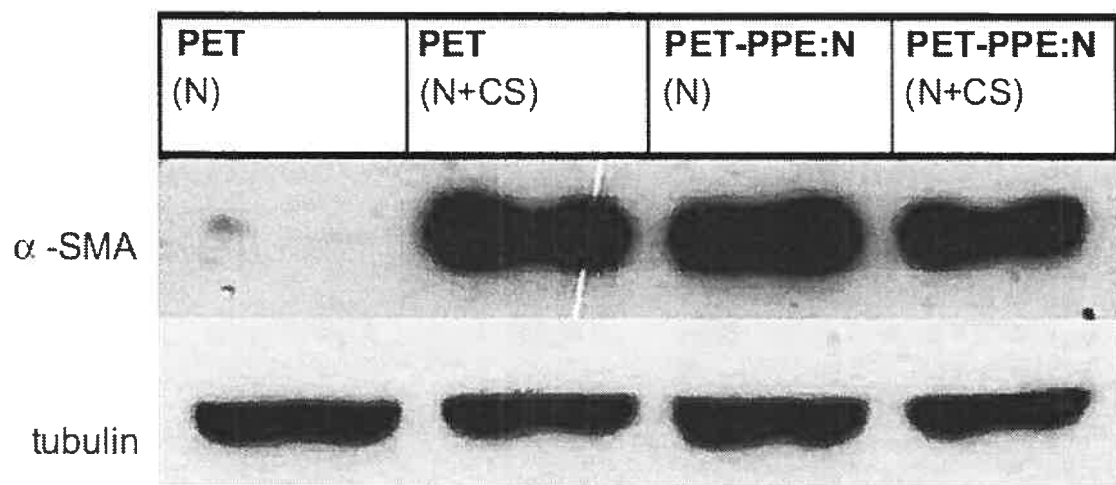


Figure 33: Immunoblotting

Immunoblotting analysis showing increased levels of α -actin in WI-38 fibroblasts when cultured on PPE:N surfaces or exposed to medium with addition of CS for 7 days. (α -tubulin is used as a control).

4. DISCUSSION

Cell behaviour on PET and PTFE

SG incorporation and biological fixation into the vessel and aneurysmal walls require the adhesion, growth and migration of the various cell types implicated in neointima formation (VSMCs, myofibroblasts) on the surface of the implant. The development of an AAA is associated with an intrinsic propensity for aortic VSMC to undergo apoptosis, leading to progressive loss of tensile forces and to aortic dilation [27, 28]. Under these circumstances, it appears particularly important to foster a state of resistance to apoptosis in VSMC and myofibroblasts in order to facilitate biological incorporation of the SG. In the present study we showed that VSMCs and fibroblasts manifested significantly less adhesion, growth and resistance to apoptosis on PET and PTFE film surfaces as compared with PCP. This was indeed expected for the case of PTFE, which has a very low surface tension and wettability (105° water contact angle). Like other strongly hydrophobic surfaces, PTFE limits protein adsorption and cell adhesion, and thus favours a programmed form of cell death called anoikis, which is induced by the loss of cell/matrix interactions [29]. Cell adhesion observed on control PTFE films was minimal and, consequently, further study (growth, differentiation, migration, apoptosis) could not be undertaken on this material. To a lesser extent, PET films also manifested lower adhesion and growth than did the PCP surfaces commonly used for cell culture. More importantly, the cells that adhered to PET were shown to be much less resistant to apoptosis induced by serum starvation. This is of special importance in the AAA environment where cells repopulating the SG from the abluminal side, and thus without direct access to blood supply, may have a limited access to growth factors. We used PET and PTFE films in this study for the purpose of

simplifying the *in vitro* experiments. Since their smooth surfaces and non-porous structures do not perfectly mimic vascular fabrics used in endovascular implants, these results need to be reproduced with commercial graft materials made of ePTFE or of woven PET fibers (Dacron^R).

Surface modification by PPE:N coating

To date, very few efforts have been reported to enhance the incorporation and to stimulate healing around stent-grafts [30]. Replacement by other polymeric graft materials such as polyurethane has been reported to improve incorporation in animal models, [14] but insufficient stability and poor mechanical properties limit the use of this material [31]. Surface modification of the external surfaces of PET or ePTFE grafts by plasma discharges appears promising for favoring cell growth and SG incorporation into the vessel wall without affecting the mechanical properties and low thrombogenicity of the luminal surface. Many efforts have been made to modify polymeric surfaces such as PET by plasma discharges [32-36]. In particular, surface functionalisation by nitrogen or ammonia low-pressure plasma had already proven to increase cell adhesion on various polymers [35, 36]. But the nitrogen concentration, [N], that could be achieved was limited and it decreased with time, an effect known as ageing, which affects surface functionalisation in general. The plasma-deposited thin PPE:N coating developed in our laboratory has several advantages over the above-mentioned surface modification, namely higher [N] value ($> 30\%$) and the absence of ageing [17, 37]. As previously reported, characterization by ATR FT-IR has shown the main functional groups in the PPE:N to be amines, nitriles and some amides. XPS analysis after chemical derivatization with trifluoromethylbenzaldehyde (TFBA, Alfa Aesar) vapour revealed 5-10% primary amine groups $[NH_2]/[N]$. The PPE:N coating possesses much higher surface energy than PET and PTFE films,

largely due to the polar component, γ_s^p , related to highly polar groups at the surface. Another advantage of the PPE:N coating is its highly cross-linked, homogeneous structure that is not subject to “hydrophobic recovery”, or ageing, unlike plasma-modified polymer surfaces. This coating can, in principle, be deposited on objects of any relevant geometry and composition. When deposited on PTFE, unlike the other substrate materials, its composition differed slightly and it appeared to be less uniform, as suggested by contact angle variations between 20 and 80 degrees in some areas. A possible explanation may be that the soft PTFE films were observed to buckle during plasma deposition, resulting in varying deposit characteristics over the surface. This surface heterogeneity may at least partly explain the differences in cell behaviours and the larger standard deviations observed for coated PTFE compared with coated PET substrates. Further work is required to achieve optimal PPE:N coatings on all surfaces of interest in this research.

Influence of PPE:N on cell behavior

As already mentioned, earlier work had already shown that PPE:N coatings promote adhesion of various cell types, including generally non-adherent U937 macrophages, mesenchymal stem cells, and chondrocytes [17, 36]. In the present study, we have shown that PPE:N coatings not only increased the densities of adherent VSMC and fibroblasts compared to virgin PET and PTFE, but also accelerated cell adhesion, spreading, and viability in normal media. More important, PPE:N drastically increased VSMC cell resistance to apoptosis induced by serum starvation, a condition that simulates the lack of nutrients in aneurysms excluded by SG deployment. Cell growth after one week was found to be significantly increased on PPE:N compared to all other surfaces, including PCP that was used as a positive control. Increased cell

growth on PPE:N could be the result of higher proliferation and/or lower cell death. Since experiments on cell death in normal culture medium did not show differences between PPE:N and PCP surfaces, results suggest that PPE:N might contribute to VSMC proliferation. This needs however to be further evaluated.. VSMC adhesion, proliferation and migration on an implant surface, as well as development of a state of resistance to apoptosis, are pivotal events for the initiation of healing around vascular implants, and for SG incorporation into the vessel wall.

Finally, as myofibroblasts are a key contractile cellular constituent of healing tissues implicated in wound closure, we evaluated whether the various surfaces and CS promote myofibroblast differentiation. Fibroblasts cultured on PPE:N coatings showed increased protein levels of α -SMA compared with virgin PET, indicative of a trend towards their differentiation into myofibroblasts. The myofibroblast is a contractile form of fibroblasts, characterised by the presence of a contractile apparatus that contains bundles of actin microfilaments. These terminate at the surfaces of the myofibroblasts, in the fibronexus – a specialized adhesion complex that uses transmembrane integrins to link intracellular actin with the ECM [26]. This provides a mechano-transduction system; that is, the force that is generated by stress fibres can be transmitted to the surrounding ECM, and it results in soft-tissue contraction. Myofibroblasts can continuously generate such forces over long periods of time; they are essential to wound closure during normal repair and could favour shrinkage of aneurysms. Hence, in our system, increasing myofibroblast differentiation could facilitate SG incorporation and facilitate populating the aneurysmal sac with contractile cells that promote aneurysm shrinkage.

Signalling pathways implicated in PPE:N-cell interactions are evidently complex and virtually unknown. Cell adhesion to biomaterial surfaces is known to be mediated by a layer of adsorbed proteins, the type, quantity and activity of which are influenced by the properties of the underlying substrate [38]. In addition to anchoring cells, adhesive interactions also activate various intracellular signaling pathways that direct cell viability, proliferation, and differentiation. Surface chemistry (in particular, the types of functional groups, for example NH_2) is known to modulate integrin binding and focal adhesion assembly, composition, and signaling. In turn, various integrin-mediated cell signaling pathways, such as focal adhesion kinase, integrin-linked kinase, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and extracellular-signal regulated kinases (Erk) are known to initiate potent anti-apoptotic signals that may at least partially explain the anti-apoptotic activity conferred by PPE:N [39, 40]. We showed recently that integrin-dependent activation of PI3K plays a key role in inhibition of apoptosis induced by growth factor deprivation [41].

Influence of CS on cell behavior

Chondroitin sulphate (CS) has recently been identified among cryptic bioactive factors released by apoptotic cells following vascular injuries. Previous work already showed that chondroitin 4-sulphate can inhibit VSMC and fibroblast apoptosis, and induce myofibroblast differentiation when cultured on PCP [18, 19]. In the present study, we confirmed that development of an apoptosis-resistant state related to the presence of CS was in evidence on each of the biomaterials surfaces tested. CS was found to add further benefit to PPE:N-coating and to allow resistance to apoptosis to reach levels similar to or even above those of PCP surfaces. Its benefit was also evident when examining VSMC migration. Possible mechanisms implicated in the

development of resistance to apoptosis by CS have been the subject of recent studies. We showed that CS can inhibit VSMC apoptosis through increased extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 phosphorylation and protein levels of Bcl-xl, an anti-apoptotic member of the Bcl-2 family in VSMC [18]. We also showed previously that CS induces resistance to apoptosis and myofibroblast differentiation through PI3K-dependent pathways [41].

5. CONCLUSIONS

A local deficit of contractile cells in aneurysms may prevent SG incorporation and aneurysm healing following EVAR. Promising *in vitro* data suggest that PPE:N-coating of the external surface of a SG, and/or the presence of CS, could help promote most of the pivotal events leading to the growth of a fibro-proliferative reaction around the implant. Due to the numerous limitations of *in vitro* studies, *in vivo* studies are required to confirm the potential of PPE:N coating. Such approaches may prove to be beneficial for better SG incorporation, and possibly for prevention of progressive growth of an aneurysm.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project has been funded by the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; grant number RMP-72548), and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ research award to SL).

REFERENCES

1. Melton LI, Bickerstaff L, Hollier L. Changing incidence of abdominal aortic aneurysms : a population-based study. *Am J Epidemiol* 1984;120:379-386.
2. Geraghty P, Sicard G. Abdominal aortic aneurysm repair in high-risk and elderly patients. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2003;44:543-547.
3. Mohan I, Harris P, Van Marrewijk C, Laheij R, How T. Factors and forces influencing stentgraft migration after endovascular aortic aneurysm repair. *J Endovasc Ther* 2002;9:748-755.
4. Kalliafas S, Albertini J, Macierewicz J, Yusuf S, Whitaker S, Davidson I, Hopkinson B. Stent-graft migration after endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. *J Endovasc Ther* 2002;9:743-747.
5. Elkouri S, Gloviczki P, McKusick MA, Panneton JM, Andrews J, Bower TC, Noel AA, Harmsen WS, Hoskin TL, Cherry K. Perioperative complications and early outcome after endovascular and open surgical repair of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2004;39(3):497-505.
6. Veith F, Baum RA, Ohki T, Amor M, Adiseshiah M. Nature and significance of endoleaks and endotension: Summary of opinions expressed at an international conference. *J Vasc Surg* 2002;35:1029-1035.
7. Schurink GW, Aarts NJ, van Bockel JH. Endoleak after stent-graft treatment of abdominal aortic aneurysm: a meta-analysis of clinical studies. *Br J Surg* 1999;86(5):581-587.
8. Greenhalgh RM, Brown LC, Kwong GP, Powell JT, Thompson SG. Comparison of endovascular aneurysm repair with open repair in patients with abdominal aortic aneurysm (EVAR trial 1), 30-day operative mortality results: randomised controlled trial. *Lancet* 2004;364(9437):843-848.
9. Prinssen M, Verhoeven EL, Buth J, Cuypers PW, van Sambeek MR, Balm R, Buskens E, Grobbee DE, Blankensteijn JD. A randomized trial comparing conventional and endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med* 2004;351(16):1607-1618.
10. McArthur C, Teodorescu V, Eisen L, Morrissey N, Faries P, Hollier L, Marin ML. Histopathologic analysis of endovascular stent grafts from patients with aortic aneurysms: Does healing occur? *J Vasc Surg* 2001;33(4):733-738.
11. Malina M, Brunkwall J, Ivancev K, Jonsson J, Malina J, Lindblad B. Endovascular healing is inadequate for fixation of Dacron stent-grafts in human aortoiliac vessels. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;19(1):5-11.
12. Major A, Guidoin R, Soulez G, Gaboury L, Cloutier G, Sapoval M, Douville Y, Dionne G and Lerouge S. Implant degradation and poor healing after endovascular treatment of abdominal aortic aneurysm : an analysis of explanted stent-grafts. *J Endov Ther (in Press)* 2006;13(4).
13. Cejna M, Virmani R, Jones R, Bergmeister H, Loewe C, Schoder M, Grgurin M, Lammer J. Biocompatibility and performance of the Wallstent and the Wallgraft, Jostent, and Hemobahn stent-grafts in a sheep model. *J Vasc Interv Radiol* 2002;13(8):823-830.
14. Marty B, Leu AJ, Mucciolo A, von Segesser LK. Biologic fixation of polyester- versus polyurethane-covered stents in a porcine model. *J Vasc Interv Radiol* 2002;13(6):601-607.

15. Jacob T, Ascher E, Hingorani A, Gunduz Y, Kallakuri S. Initial steps in the unifying theory of the pathogenesis of artery aneurysms. *J Surg Res* 2001;101(1):37-43.
16. Thompson RW, Liao S, Curci JA. Vascular smooth muscle cell apoptosis in abdominal aortic aneurysms. *Coron Artery Dis* 1997;8(10):623-631.
17. Girard-Lauriault PL, Iordanova M, Demers C, Desjardins P, Wertheimer MR. Atmospheric Pressure Deposition of Micropatterned Nitrogen-Rich Plasma-Polymer Films for Tissue Engineering. *Plasma Processes and Polymers* 2005;2:263-270.
18. Raymond MA, Desormeaux A, Laplante P, Vigneault N, Filep JG, Landry K, Pshezhetsky AV, Hebert MJ. Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on VSMC. *Faseb J* 2004;18(6):705-707.
19. Laplante P, Raymond MA, Gagnon G, Vigneault N, Sasseville AM, Langelier Y, Bernard M, Raymond Y, Hebert MJ. Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial apoptosis: implications in the pathophysiology of systemic sclerosis. *J Immunol* 2005;174(9):5740-5749.
20. Lerouge S, Wertheimer MR. Plasma sterilization : a review of parameters, mechanisms and limitations. *Plasmas & Polymers* 2001;6(3):177-190.
21. Kaelble DH. *Physical Chemistry of Adhesion*. New York: J. Wiley & Sons; 1974.
22. Hebert MJ, Takano T, Holthofer H, Brady HR. Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxigenase-derived eicosanoids. *J Immunol* 1996;157(7):3105-3115.
23. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte- Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 1995;21(5):1465- 1468.
24. Raymond MA, Desormeaux A, Labelle A, Soulez M, Soulez G, Langelier Y, Pshezhetsky AV, Hebert MJ. Endothelial stress induces the release of vitamin D-binding protein, a novel growth factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338(3):1374-1382.
25. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 2003;302(5651):1704-1709.
26. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(5):349-363.
27. Stehbens. Pathology and pathogenesis of degenerative atherosclerotic aneurysms. In: PB KRaD, editor. *Development of aneurysms: Eurekah Edition*; 2000. p 84-125.
28. Tang PC, Coady MA, Lovoulos C, Dardik A, Aslan M, Elefteriades JA, Tellides G. Hyperplastic cellular remodeling of the media in ascending thoracic aortic aneurysms. *Circulation* 2005;112(8):1098-1105.
29. Michel JB. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(12):2146-2154.
30. Van der Bas JM, Quax PH, van den Berg AC, Visser MJ, van der Linden E, van Bockel JH. Ingrowth of aorta wall into stent grafts impregnated with basic fibroblast growth factor: a porcine in vivo study of blood vessel prosthesis healing. *J Vasc Surg* 2004;39(4):850-858.

31. Christenson EM, Dadsetan M, Wiggins M, Anderson JM, Hiltner A. Poly(carbonate urethane) and poly(ether urethane) biodegradation: in vivo studies. *J Biomed Mater Res A* 2004;69(3):407-416.
32. Gupta B, Plummer C, Bisson I, Frey P, Hilborn J. Plasma-induced graft polymerization of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) films: characterization and human smooth muscle cell growth on grafted films. *Biomaterials* 2002;23(3):863-871.
33. Xie Y, Sproule T, Li Y, Powell H, Lannutti JJ, Kniss DA. Nanoscale modifications of PET polymer surfaces via oxygen-plasma discharge yield minimal changes in attachment and growth -+--+ of mammalian epithelial and mesenchymal cells in vitro. *J Biomed Mater Res* 2002;61(2):234- 245.
34. Pu FR, Williams RL, Markkula TK, Hunt JA. Effects of plasma treated PET and PTFE on expression of adhesion molecules by human endothelial cells in vitro. *Biomaterials* 2002;23(11):2411-2428.
35. Bullett NA, Bullett DP, Truica-Marasescu FR, Lerouge S, Mwale F, Wertheimer MR. Polymer surface micropatterning by plasma and UV-photochemical modification of controlled cell culture. *J Applied Surface Science* 2004;235(4):395-405.
36. Nelea V, Luo L, Demers CN, Antoniou J, Petit A, Lerouge S, Wertheimer MR, Mwale F. Selective inhibition of type X collagen expression in human mesenchymal stem cell differentiation on polymer substrates surface-modified by glow discharge plasma. *J Biomed Mater Res A* 2005;75(1):216-223.
37. Guimond S RI, Czeremuszkin G, Carlsson DJ, Wertheimer MR. Biaxially oriented polypropylene (BOPP) surface modification by nitrogen atmospheric pressure glow discharge (APGD) and by air corona. *Plasmas & Polymers* 2002;7(1):71-88.
38. Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials* 2004;25(28):5947- 5954.
39. Frisch S and Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Curr Op Cell Biol* 2001; 13:555-562.
40. Schwartz MA, Ginsberg MH. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol* 2002;4(4):E65-E68.
41. Laplante P, Raymond MA, Labelle A, Abe JI, Iozzo RV, Hebert MJ. Perlecan proteolysis induces an $\alpha 2 \beta 1$ integrin and Src-family kinases dependent anti-apoptotic pathway in fibroblasts in the absence of focal adhesion kinase activation. *J Biol Chem*. 2006 Aug 1; [Epub ahead of print].

CHAPITRE V – DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Des progrès immenses ont été accomplis dans le traitement des AAA depuis 15 ans. Malgré les nombreux avantages que comporte le traitement minimalement invasif par voie endovasculaire, les fréquentes complications limitent présentement son utilisation. Il serait souhaitable qu'un plus grand nombre de patients puissent bénéficier de ce traitement avantageux. Dans le cadre de mon projet de maîtrise, j'ai voulu déterminer le rôle respectif de la dégradation des implants et du manque de guérison autour des EC dans les cas d'échec. Pour cela, nous avons analysé des EC explantées provenant de conversion chirurgicale et d'autopsie.

V -1- Complication et échecs reliés à la dégradation de l'implant

Les études précédentes ont démontré que les premières générations d'EC ont connu des problèmes importants de dégradation in vivo [132, 134, 135, 177, 178, 262] et des complications majeures [263, 264]. Les dommages importants que nous avons observés sur les EC de type Vanguard dans notre étude, étaient donc prévisibles, puisque ces endoprothèses ont été retirées du marché justement à cause de leur instabilité biomécanique. Malgré leur retrait du marché, plusieurs patients ont toujours ce type d'EC et il est important de les analyser pour mieux comprendre les mécanismes d'échecs, et leur stabilité à long terme. Depuis ces échecs, des modifications importantes ont été apportées au design de EC pour leur permettre d'avoir une meilleure résistance mécanique, éviter les plicatures et résister à la corrosion [139].

Les EC de type AneuRx et Talent sont toujours commercialisées. Dans plusieurs études cliniques, ces endoprothèses ont été associées avec une réduction de l'incidence de la migration, de la plicature, de l'occlusion des jambes et des interventions secondaires [265-268] comparativement au Vanguard [110]. Une étude a tout de même mis en évidence une thrombose des jambes iliaques pour les AneuRx [109] et des problèmes importants de migration pour les AneuRx et les Talent [149, 151, 269, 270]. Ces études et nos résultats démontrent que malgré les efforts fournis par les fabricants, le design, la qualité et le fini de surface des biomatériaux utilisés ne sont toujours pas optimaux. Les deux fractures constatées sur les fils métalliques des Talent, qui ont un diamètre important, sont inquiétantes. **Ces fractures sont la cause directe de deux conversions chirurgicales.** Le fabricant des Talent a modifié en 2003 la qualité du fini de surface et le design de l'EC. La barre de connection dans les jambes iliaques de l'endoprothèse a été déplacée d'une position médiale à une position latérale pour corriger les bris qui surviennent fréquemment dans cette partie [271]. Est-ce que ce design sera plus adéquat ? Il est difficile de prédire le comportement *in vivo* de ce type d'implant, et il faut parfois attendre plusieurs mois, voire plusieurs années d'implantation pour déceler les problèmes ou les risques de bris d'un EC. Par exemple, dans le cas des Talent, le déplacement de la barre de connection pourrait rendre la prothèse moins résistante à la plicature et/ou trop rigide, ce qui pourrait donc créer un problème nouveau en cherchant à régler un problème actuel. Ceci illustre le difficile l'équilibre à trouver, pour les compagnies, entre le besoin d'une mise en marché rapide d'une nouvelle technologie et le temps d'essai et de recherches nécessaires pour s'assurer que celles-ci soient un succès. Les études indépendantes comme la nôtre aident les fabricants et les utilisateurs (radiologues, chirurgiens) à déceler les points faibles et les points forts de chaque prothèse sur le marché. Idéalement, elles devraient être effectuées avant même la mise en marché d'une nouvelle prothèse.

Dans notre étude, nous avons évalué l'épaisseur de la couche d'oxyde et la qualité du fini de surface par AES et MEB. La présence de Ni à la surface de tous les EC, parfois en quantité importante, et l'irrégularité de la surface observée sur les endoprothèses contrôles montrent que le fini de surface de ces implants n'était pas propice à une bonne résistance à la corrosion du NiTi [271]. La corrosion pourrait induire le largage d'ions nickel cytotoxiques dans l'organisme [142, 271, 272]. Elle peut avoir mené à la rupture des fils métalliques que nous avons observée. Cependant, les endoprothèses analysées avaient été implantées entre 1997 et 2002 et depuis, des modifications ont été apportées par les compagnies. Un registre public et/ou une plus grande transparence des méthodes de fabrications utilisées permettraient d'avoir des contrôles valables pour comparer avec les EC explantées (explants et prothèses contrôles produisent en même temps avec même processus et traitement de surface).

Dans notre analyse par AES, nous avons analysé des petites sections de chaque échantillon, il faudrait, dans l'avenir, analyser plus de sites sur un même échantillon pour avoir des valeurs représentatives de l'ensemble de l'EC. Peut-être découvrirons-nous que certaines sections des EC sont plus à risque de corrosion que d'autres, du au stress auquel ils sont soumis et nous pourrions ainsi identifier les zones de stress mécanique ?

V -2 La guérison autour de l'EC est-elle possible ?

Après le déploiement de l'EC dans l'anévrisme, un thrombus se forme des deux cotés de l'EC, soit : 1) dans la lumière et 2) entre l'EC et la paroi anévrismale. Comme nous l'avons énoncé plus tôt dans la revue de la littérature, ce thrombus devrait évoluer vers un tissu fibreux qui incorpore l'implant à la paroi aortique [201]. Ceci offrirait une étanchéité permanente aux collets

et exclurait l'anévrisme d'une manière définitive, ce qui préviendrait les complications. La néointima, la capsule externe et l'espace périgraft auquel je ferai référence par la suite sont illustrés dans la figure 34.

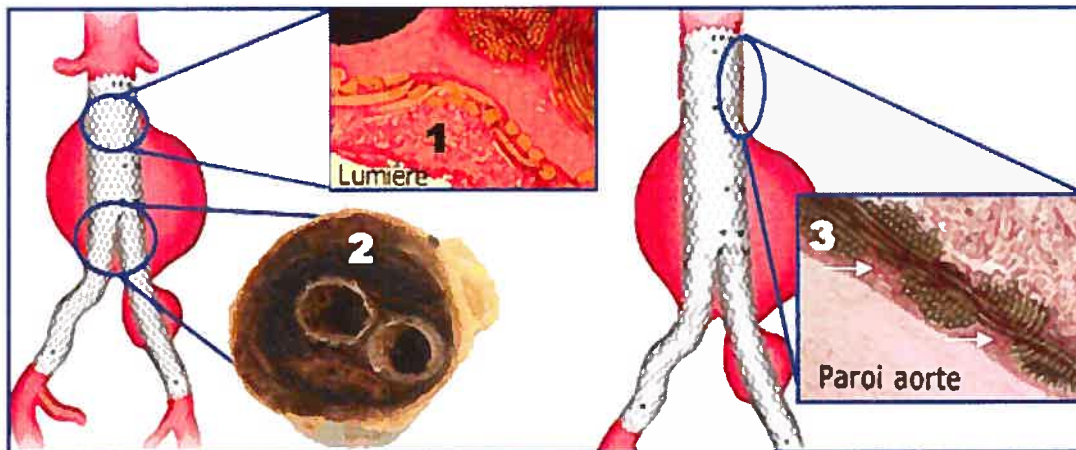


Figure 34: Rappel des différents termes dans la guérison tissulaire entourant les EC.

1. La néointima est le tissu situé dans la lumière de l'EC ou de l'artère 2. La capsule externe est le tissu qui se forme à l'extérieur de l'EC entre celle-ci et la paroi anévrismal 3. L'espace périgraft fait partie de la capsule externe (flèche blanche), puisqu'il est entre l'EC et la paroi, mais on le définit comme le caillot non organisé qui subsiste entre l'EC et la paroi même lorsque ceux-ci sont accolés, comme aux collets.

V -2-1 Guérison tissulaire déficiente observée

Les processus de réparations vasculaires, activés par différentes formes d'insulte vasculaire, conduisent normalement à la formation d'une néointima. Ces mécanismes de guérison mènent normalement à 3 étapes consécutives : 1) à la migration, la résistance à l'apoptose et l'accumulation de CMLV et des myofibroblastes, 2) à une production et une accumulation de MEC 3) à la disparition des cellules impliquées dans la réparation cellulaire (CMLV, fibroblaste,

PNM,...) par apoptose après que l'intégrité tissulaire ait été retrouvée [185, 188]. Si ces étapes ne s'effectuent pas complètement ou se font dans le désordre, la réaction fibroproliférative peut devenir chronique et peut mener à des effets pathologiques comme la resténose après la pose d'un stent, où la lumière du vaisseau est obstruée par une hyperplasie néointimale [25]. Nous avons observé durant ce projet qu'au contraire, dans le cas des EC implantées dans les AAA, la formation d'une néointima et d'une capsule externe fibreuse autour de EC est déficiente. La néointima est immature avec aucune cellule positive pour α -SMA, qui est caractéristique des CMLV et des myofibroblastes nécessaires pour la guérison vasculaire. La néointima est constituée essentiellement, sauf dans le cas du début de guérison, de fibrine et de globules rouges, avec une absence de collagène, de CMLV et de CEV. Les CEV étant très fragiles, elles ont pu être perdues dans la préparation et la conservation des explants. Les études précédentes ont aussi observé ce manque d'organisation de la néointima [154, 180, 181]. En accord avec les observations de Malina et al. nous avons aussi observé la présence d'un espace périgraft constitué de thrombus amorphe entre l'EC et la paroi vasculaire [154]. Cet espace non organisé démontre bien le manque d'incorporation de l'EC à la paroi aortique même après plusieurs années d'implantation. Pour ce qui est de la capsule externe, elle est aussi constituée de thrombus amorphe et elle n'évolue pas vers une capsule fibreuse. L'EC baigne parfois dans un thrombus semi-liquide au niveau de l'anévrisme [180, 181]. Cette constatation peut nous laisser supposer que la thrombose dans le sac anévrisimal est partielle. Qu'est ce qui peut expliquer cette thrombose partielle même après plusieurs mois ? Les phénomènes thrombolytiques qui peuvent survenir au contact de l'EC et la prise d'anti-coagulant par les patients peuvent expliquer une partie de ce problème.

Cette absence d'organisation autant de la néointima que de la capsule externe limite l'incorporation de l'EC dans la paroi aortique pour la maintenir en place solidement. Les travaux antérieurs ont mis en évidence que les EC se détachent facilement de l'aorte et du sac anévrismal [154, 180]. Les observations des chirurgiens vasculaires qui retirent les EC vont dans le même sens. La fixation des EC est purement mécanique, soit par la force radiale. Cette force radiale pourrait être l'un des facteurs menant à la progression de l'anévrisme au collet comme dans l'un des cas que nous avons étudié [274, 275] et cet élargissement au collet est un facteur déterminant dans la migration des EC [149].

V -2-2 Réaction inflammatoire persistante

Comme dans les études précédentes, nous avons constaté la présence d'une réaction inflammatoire près des fibres de Dacron. La présence de macrophages et de cellules géantes multinuclées est caractéristique d'une réaction à corps étranger [276]. Cette réaction, très typique à l'implantation de biomatériaux, provient de l'incapacité par les macrophages à éliminer une substance qu'ils ont identifiée comme étrangère [276]. Par contre, cette inflammation n'est pas accompagnée, comme dans le cas de prothèses vasculaires, d'une infiltration de CMLV et de fibroblastes reconnue comme essentiel pour une incorporation adéquate. Toutes les EC que nous avons analysées étaient fabriquées en Dacron, il serait intéressant d'avoir un biomatériau qui évite cette réaction. Des études précédentes sur des EC en PTFE, on permis d'observer une réaction à un corps étranger semblable à celle du Dacron [277, 278].

Nous avons observé la présence de nombreuses cellules polymorphonucléaires (PMN) dans les tissus prélevés avec les EC même plusieurs années après leur implantation. Cette persistance

d'une telle réaction inflammatoire n'avait jamais été documentée auparavant. La première étape de la guérison vasculaire qui est une infiltration du tissu par les PMN dure normalement quelques jours, ou, au plus, quelques semaines [279]. L'inflammation est un événement majeur pour le recrutement de myofibroblaste provenant de l'adventice [192]. À la suite d'une lésion, les PMN sont dans les premières cellules à arriver. Ce sont des cellules qui libèrent beaucoup de médiateurs de l'inflammation comme des cytokines, des espèces réactives de l'oxygène et des MMP. Les médiateurs libérés par les PMN attirent les macrophages et les lymphocytes qui prendront en charge la réparation tissulaire. Par la suite, les PMN vont disparaître progressivement par apoptose. Les lymphocytes et les macrophages vont, pour leur part, sécréter des médiateurs qui vont attirer les CMLV et les fibroblastes au site de l'insulte, dans le processus normal. La présence des PMN quatre ans après l'implantation est un signe de la persistance de l'inflammation et démontre que la capacité d'organisation en une néointima mature a été compromise. La cause de cette persistance de l'inflammation n'est pas claire. Une caractérisation de l'infiltrat inflammatoire devrait être la prochaine étape. L'interleukine-8 (IL-8) est la cytokine sécrétée en plus grande quantité par les PNM suite à une lésion à la paroi [279]. Une coloration pour détecter la présence de l'IL-8 donnerait de bonnes indications sur l'origine du problème. Cela signifierait qu'il y aurait une insulte permanente, comme un stress biomécanique, qui provoque cet infiltrat inflammatoire pendant plusieurs années. Cet infiltrat de PMN vient aussi appuyer l'hypothèse que la néointima n'est pas endothélialisée ou, du moins pas de façon mature, et non que les CEV ont été perdus dans le processus d'analyse des tissus. En effet, la présence d'un endothélium normal et non activé permet de contrôler l'infiltration des tissus par les cellules inflammatoires, et réduit de manière importante cette infiltration de PNM à trois mois d'implantation dans des études sur le chien [207]. Le développement de meilleures

techniques de coloration pour l'histologie Exakt permettrait d'avoir une meilleure caractérisation des cellules et des tissus qui sont à l'interface tissu/implant.

V -2-3 Cas de guérison

Malgré le manque de guérison constaté, un spécimen AneuRx montrait un début d'organisation de la néointima après seulement 6 semaines d'implantation. Par contre, la guérison était limitée d'en seul côté de l'EC, soit dans la lumière de l'endoprothèse. Cette constatation vient renforcer l'hypothèse que le greffon ne permet pas aux cellules de le coloniser dû à un manque de porosité. Par contre, le temps d'implantation court ne nous permet pas d'être sûr que les cellules n'auraient pas finies par passer de l'autre côté. Les raisons qui expliqueraient la différence entre cet AneuRx et un autre qui après plus de deux ans montrait une guérison inadéquate, restent à éclaircir et cela demande une investigation plus poussée. Le degré d'athérosclérose de l'aorte abdominale et des iliaques ainsi que l'apposition de l'EC lors de la mise en place de la prothèse peuvent être des hypothèses plausibles. Le design de l'implant et ses propriétés biomécaniques peuvent aussi jouer un rôle dans le manque de guérison que nous et les autres avons observé. Il est important de faire la distinction entre les réussites cliniques, qui sont des cas où les patients ne manifestent pas de complications ou d'effets adverse à cause de l'EC et les cas de réussite biologique, qui représentent une guérison adéquate et une incorporation de l'EC. Il faudrait pouvoir analyser plus de cas de réussite clinique pour pouvoir conclure sur les facteurs déterminants dans ces cas de succès. Par contre, l'étude de EC explantés par Malina et al. a analysé neuf cas de réussite clinique, et aucun ne montrait une néointima organisée, donc aucune réussite biologique [154].

V -2-4 Les facteurs qui peuvent expliquer la mauvaise guérison.

Les EC sont aussi utilisées pour traiter plusieurs maladies vasculaires périphériques. Elles sont utilisées, par exemple, dans le traitement des occlusions des artères périphériques comme les iliaques ou les fémorales. Dans ces applications périphériques, les EC sont bien incorporées à la paroi dans une capsule fibreuse, et comme dans les « stents », la resténose est une complication qui peut survenir [280, 281]. Nos résultats suggèrent que le manque d'incorporation doit pouvoir s'expliquer par différents facteurs qui sont inhérents à notre modèle, soit un contexte anévrisimal et les propriétés de surfaces des biomatériaux utilisés.

V-2-4-1 La physiopathologie des AAA

La physiopathologie des AAA où l'EC est insérée peut expliquer le manque de guérison observé à la suite de l'implantation des EC. La destruction de la média, la déplétion des CMLV jusqu'à 75% et leur phénotype pro-apoptotique ne sont pas favorables à leur prolifération [70]. Les cellules présentes dans la paroi anévrismale sont quiescentes et dans un état non-prolifératif. Ceci contraste avec les caractéristiques cellulaires requises pour la formation d'une néointima organisée, soit une résistance à l'apoptose, une migration des cellules et un état prolifératif. En plus, l'EC est déployée sur des plaques athérosclérotiques, ce qui ne facilite pas la régénération des tissus et l'incorporation des EC au collet. [64, 67] Ces plaques d'athérosclérose sont souvent ulcérées et les CEV sont absentes ou endommagées. La réaction inflammatoire présente dans la paroi anévrismale permet la sécrétion de plusieurs molécules qui dégradent la MEC. Cette dégradation de la MEC peut être amplifiée par la présence des PMN qui sécrètent eux aussi des

enzymes comme les MMP. Cette inflammation rend plus difficile la formation d'un tissu organisé. En plus de ces facteurs biologiques, l'EC dans la portion du sac anévrisimal n'est pas en contact avec la paroi, ce qui empêche une colonisation directe du greffon. Les cellules doivent donc provenir des collets (ou bien traverser le thrombus), ce qui représente une grande distance de migration pour tous les types cellulaires. Nous avons aussi remarqué dans nos travaux que l'EC est souvent mal dimensionnée et/ ou mal déployée, ce qui entraîne une mauvaise apposition du greffon à la paroi et des replis dans le recouvrement polymérique. Cette mauvaise apposition est un facteur supplémentaire qui peut entraîner une mauvaise incorporation de l'EC à la paroi.

V-2-4-2 Propriétés de surface des biomatériaux

L'utilisation de recouvrement polymérique en Dacron ou en PTFE peut expliquer en partie le manque de guérison observé. Un facteur qui limite la guérison est que la faible porosité des biomatériaux utilisés diminue les possibilités de colonisation du greffon et de migration à travers le greffon par les cellules progénitrices circulantes [154, 208]. En plus, les propriétés de surfaces des biomatériaux utilisés (PET et PTFE) ne sont pas optimales pour favoriser l'incorporation et la guérison autour de EC. Les cellules doivent pouvoir adhérer, et proliférer à la surface du greffon, sans mourir par apoptose ou par nécrose. La grande hydrophobicité du PTFE limite l'absorption de protéines à sa surface, ce qui ne favorise pas l'adhésion des cellules [247, 248]. Dans notre étude sur les films de PTFE nous n'avons observé pratiquement aucune cellule ce qui démontre que ce biomatériau n'est pas adéquat pour favoriser une guérison tissulaire. En plus, les rares cellules présentes sur le PTFE après 4 heures d'adhésion étaient très petites, très rondes et en amas, ce qui peut supposer qu'elles sont en anoikis, un type de mort par apoptose

programmée lorsqu'une cellule se détache d'une surface. Ces caractéristiques nous laissent supposer que ces cellules allaient se détacher de la surface [69]. Le PET est moins inerte, mais les études ont observé que c'est encore insuffisant pour promouvoir une bonne incorporation [203, 209, 244, 246, 250]. Dans nos travaux sur les films de PET, les cellules adhèrent et croissent mais de façon significativement plus faible qu'à la surface des puits de PCP et elles sont sensibles à la mort par apoptose. Nous avons ainsi observé un taux d'apoptose important ($35 \pm 4\%$) des VSMC après 8 heures en milieu sans sérum. Ce taux élevé d'apoptose montre que les cellules tolèrent mal une carence en nutriment lorsqu'elles sont adhérentes au PET. Les cellules qui adhèrent au côté extérieur du greffon de l'EC ne sont pas en contact direct avec la circulation sanguine, ce qui limite l'apport en facteurs de croissance. Ces données suggèrent que le PET n'est pas favorable à la croissance d'un tissu fibreux à sa surface et pourrait participer au manque de guérison autour des EC. Par contre, pour tous les essais, nous nous sommes servis de PET en film et comme nous le verrons plus loin, les films de PET sont moins poreux et rugueux que le Dacron.

V -3 Quelle est la cause des cas d'échec ?

Aucune étude jusqu'à maintenant n'avait étudié simultanément la dégradation des biomatériaux et la guérison autour des EC. Le rôle respectif de la dégradation des biomatériaux et du manque de guérison dans les cas d'échec est difficile à définir. Les cas d'échec directement liés à la dégradation de l'implant sont moins nombreux qu'avec les prothèses de 1^{ère} génération, mais ils existent toujours. Ainsi, deux cas d'échec des prothèses Talent étaient directement reliés à la dégradation de l'endoprothèse. Dans un cas, le bris d'un fil métallique au collet a causé une endofuite massive de type I et cette endofuite a causé une rupture de l'anévrisme. Dans l'autre

cas, c'est un trou dans le greffon qui a aussi entraîné une endofuite et le retrait de l'endoprothèse. La réaction inflammatoire persistante observée autour des implants pourrait avoir accélérée la dégradation des biomatériaux [282, 283].

Il est plus difficile d'établir un lien direct entre le manque de guérison tissulaire constaté et les cas d'échec. Dans notre étude, trois cas d'échec ne sont pas reliés à la dégradation de l'implant, et peuvent être associés à un manque de guérison tissulaire. Bien que ce manque d'organisation, ne soit pas la seule cause dans les autres cas d'échec, tous, sauf un, démontrent une guérison inadéquate et un manque d'incorporation de l'implant à la paroi aortique. Le manque de guérison peut être la cause, bien que le lien direct ne puisse pas être établi de manière scientifique. En plus, dans les cas d'échec qui sont directement reliés à la dégradation de biomatériaux, la dégradation des EC pourrait être évitée ou du moins les bris dans la structure auraient des conséquences réduites si les EC étaient incorporées dans une capsule fibreuse importante. Une autre caractéristique du manque d'organisation des tissus est l'inflammation persistante autour de l'EC qui limite la guérison et la régénération de la MEC. Les enzymes sécrétées par les PMN augmentent la dégradation de la MEC, ce qui peut faciliter la formation d'un anévrisme au collet et permettre au sac anévrysmal de continuer à augmenter de diamètre. Ce manque de guérison observé même après plusieurs années d'implantation empêche l'EC d'être incorporée adéquatement à la paroi aortique et d'y être ainsi solidement fixée. Cette guérison tissulaire inadéquate est associée au cas d'échec et il serait souhaitable de remédier à cette situation pour minimiser les complications.

Pour l'avenir de ce projet, il faudrait analyser d'autres EC explantées et récupérer plus de cas d'autopsie qui nous permettrait d'analyser l'interface entre la paroi aortique et l'EC. Des

considérations éthiques et techniques ont limité le nombre d'explants obtenus par l'équipe, en particulier le nombre de cas d'autopsie. En plus, nous avons récupéré trois types d'endoprothèses, dont un type (les Vanguard) qui n'est plus commercialisé. Il serait nécessaire d'analyser d'autres modèles qui sont présentement commercialisés pour pouvoir effectuer une comparaison entre les différents modèles disponibles sur le marché. En plus, il faudrait raccourcir le temps entre le retrait de l'EC du patient et l'analyse des tissus. Certains de nos spécimens ont été conservés dans le formol pendant quelques années avant d'être analysés. L'impact de cette conservation sur les résultats de nos analyses est difficile à déterminer. L'utilisation de modèles animaux, comme le modèle canin bilatéral reproduisant les fuites, développé par l'équipe des Dr Lerouge et Soulez [207] sont d'autres sources d'information potentielles sur les mécanismes d'échec.

V-4- Vers une EC bioactive....

Notre étude sur les EC explantées nous a démontré que la guérison tissulaire est inadéquate autour des EC. Ce manque de guérison observé est lié, selon notre hypothèse, au choix des biomatériaux qui ne favorisent pas l'adhésion des cellules et au contexte physiopathologique des AAA, soit une déplétion des CMLV et leur phénotype pro-apoptotique. Le développement d'un revêtement sur la surface extérieure des EC (du côté de la paroi aortique) qui favoriserait l'adhésion, la prolifération, la migration et la résistance à l'apoptose des cellules devrait aider à augmenter la fixation biologique des EC dans la paroi anévrysmale et ainsi réduire les complications suite à ce traitement endovasculaire. L'avenir des EC passe donc par la stimulation de la guérison avec des médiateurs ou des revêtements à la surface abluminale des biomatériaux. Pour l'instant, les seuls travaux dans ce sens sont ceux de Vander Bas et al. qui

ont développé un revêtement de collagène avec du bFGF [210, 211], mais celui-ci a été testé dans un modèle porcin. Or, il a été démontré que le porc a une réaction inflammatoire importante et guérit beaucoup mieux que l'humain [201, 284]. Nous avons choisi de recouvrir le PET et le PTFE par un revêtement innovateur, un film fin riche en azote déposé par plasma atmosphérique, le PPE :N. Il a été démontré que ce nouveau matériau favorise l'adhésion de plusieurs types cellulaires [257-259]. Nous avons évalué son potentiel pour la guérison vasculaire sur des VSMC et des fibroblastes. Nous avons aussi testé l'effet de la chondroïtine sulfate (CS) pour ses effets cellulaires récemment découverts, soit son effet anti-apoptotique sur les CMLV et les fibroblastes [232, 235] et son effet favorable sur la différenciation des fibroblastes [235]. La différenciation de fibroblaste en myofibroblaste est une étape cruciale dans notre modèle, puisque le myofibroblaste a un phénotype contractile et il sécrète de la MEC [185]. Il a le pouvoir de contracter les plaies, ce qui pourrait s'avérer utile dans le contexte de la guérison de l'anévrisme. Effectivement, il pourrait réduire le diamètre du sac anévrisimal et éviter l'expansion de l'anévrisme.

V -4-1 Le PPE:N comme revêtement de la surface

Nos essais cellulaires ont démontré que le PPE:N comme revêtement de surface, favorise l'adhésion cellulaire, la migration, la croissance cellulaire, la différenciation et la résistance à l'apoptose par rapport aux surfaces de PET et de PTFE contrôles. Ces événements sont cruciaux dans la fixation de l'EC à la paroi. Les meilleurs résultats avec le PPE:N seul ont été obtenus sur le PET.

Une fois que les cellules sont adhérentes aux biomatériaux, leur résistance à l'apoptose est une étape cruciale. Les cellules adhérentes au PET sont moins résistantes à l'apoptose induit par une privation de facteurs de croissance. Qu'est ce qui diffère entre le PET et le PET+PPE:N pour les cellules qui y sont adhérentes soient plus résistantes à l'apoptose ? Bien que l'adhésion cellulaire sur le PPE:N n'est probablement pas spécifique, les protéines adhérentes sur le PPE:N permettent sûrement une adhésion via des récepteurs intégrines et d'activer les mécanismes de survie cellulaire [285, 286]. L'implication des intégrines et l'activation des mécanismes intracellulaires des CMLV et des fibroblastes sur le PPE :N devraient être étudiées et comparées au PET pour permettre de mieux interpréter les résultats que nous avons obtenus. Les surfaces riches en azote et plus particulièrement en groupement amine sont reconnues pour favoriser une forte adhésion cellulaire [257, 259]. Les cellules ainsi adhérentes peuvent activer des voies métaboliques qui leur permettent de résister à l'apoptose, de migrer, de proliférer et de se différencier.

Nos résultats sur le PTFE+PPE:N sont plus variables que sur le PET+PPE:N et les cellules ne sont pas réparties uniformément sur la surface du PTFE+PPE:N. Ceci peut s'expliquer par le fait que la technique de déposition sur le PTFE n'est pas encore au point puisque le PTFE gondole, dû à son épaisseur, et par conséquent, le revêtement n'est pas uniforme sur toute la surface. Sur le PTFE, il y a de grandes différences dans la mesure de l'angle de contact (30-80degré) comme le démontre bien l'écart type. Bien que la technique ait été modifiée une première fois pour éliminer la présence de fluor, elle doit encore être travaillée.

V -4-2 La CS comme médiateur

L'ajout de CS dans le milieu de culture favorise la migration, la différenciation et la résistance à l'apoptose. Le site actif de la CS pourrait être son groupement sulfate et ainsi, la CS pourrait interagir avec des récepteurs connus comme la L-sélectine, la P-sélectine ou le CD44 [236]. Plus précisément, les mécanismes cellulaires possiblement impliqués dans la résistance à l'apoptose par la CS ont récemment été étudiés. Il a été démontré que la CS inhibe l'apoptose chez les CMLV en augmentant la phosphorylation de ERK $\frac{1}{2}$ (extracellular signal-regulated kinases) et le niveau des protéines Bcl-xl, un membre de la famille anti-apoptotique de Bcl-2 [69]. Chez les fibroblastes, la CS induirait une différenciation cellulaire en activant la voie métabolique des PI3-K [235]. Ces mécanismes cellulaires sont directement impliqués dans la formation néointimale. L'activation de ces voies métaboliques permet de penser que la CS est un médiateur de choix dans notre modèle.

Lorsque la CS est utilisée avec le PPE:N, il y a un effet combiné plus grand que l'un ou l'autre seul. Cet effet additif a été observé dans les essais de migration et de résistance à l'apoptose. Il pourrait être intéressant de l'utiliser en créant un revêtement combinant le CS et le PPE:N. Cependant, le comportement d'un tel revêtement peut être différent de ce que nous avons observé, puisque la CS pourrait cacher certains groupements fonctionnels du PPE:N et inhiber une partie de ses effets sur les cellules.

V -4-3 Les limites de notre approche et travaux futurs

Le Dacron utilisé dans les EC, comme nous l'avons vu précédemment, est un tissage de fibres de polyester et le PTFE est utilisé sous sa forme expansée, donc les films que nous avons utilisé pour effectuer nos essais ont une rugosité et une porosité moins importante. Or la rugosité et la porosité des surfaces sont reconnues pour augmenter l'adhésion cellulaire [288]. Nos résultats démontrent que le PPE:N améliore l'adhésion, la résistance à l'apoptose, la migration, la croissance cellulaire des CMLV et la différenciation des fibroblastes par rapport aux surfaces contrôles que nous avons utilisées. L'écart entre les résultats des surfaces modifiées avec le PPE:N et les surfaces contrôles de PET et de PTFE pourraient diminuer si nous utilisons des biomatériaux plus réalistes qui ont une plus grande rugosité et une plus grande porosité. Par exemple, le fait d'avoir eu une quasi-totale absence de cellules sur le PTFE aurait pu être différent si nous avions utilisé du ePTFE. Par contre, plusieurs études ont observé les mauvaises propriétés du ePTFE [277, 278]. Pour la première phase d'étude du revêtement en PPE:N, il était logique d'utiliser des matériaux abordables et plus faciles de manipulation (moins épais et moins opaque). Il est évident, par contre, que les tests cellulaires utilisés devront être répétés sur du Dacron et du ePTFE.

Par contrainte de temps, les tests de migration, d'apoptose et de croissance cellulaire sur les fibroblastes n'ont pas pu être effectués. Certains essais sur les CMLV devront être complétés avec la CS, comme l'adhésion. Les CMLV que nous avons utilisées ne sont pas des cellules humaines, mais des cellules de rats. Nous les avons utilisées pour leur facilité de culture et leur coût plus abordable que les CMLV humaines. L'essai avec des CMLV humaines serait une prochaine étape importante.

Pour les tests d'adhésion, nous avons utilisé une technique de comptage manuel des cellules colorées au cristal violet. Le comptage est une tâche très longue, mais il permet d'évaluer simultanément la morphologie des cellules. Après 4 heures d'adhésion sur les surfaces modifiées, les cellules sont très étalées et se chevauchent ce qui rend le comptage plus difficile et moins précis. Ces essais sont en train d'être reproduits en utilisant le test colorimétrique avec le sel de tétrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Cette méthode, couramment utilisée dans le domaine des biomatériaux, permet une mesure rapide des cellules vivantes capables de métaboliser le sel en cristaux de formazan [288]. Cette méthode permettrait de comparer la quantité de cellules viables, tandis que le cristal violet ne permet pas de faire la distinction entre les cellules mortes, sur le point de se détacher et celles qui sont vivantes.

Pour les essais de migration, nous avons utilisé un test simple consistant à faire une strie et observer combien de cellules migraient dans cet espace [234]. Par contre, dans les tissus, les cellules sont dans une structure tridimensionnelle. Il faudrait pouvoir évaluer la migration dans une structure plus complexe, comme dans une matrice de fibrine (thrombus) ou de collagène (tissu fibreux) pour mieux prédire le comportement *in vivo* du PPE:N. Des essais avec des Transwells seraient la prochaine étape. Ce test consiste à faire migrer les cellules à travers une membrane pour évaluer leur capacité migratoire et l'effet chemotactique d'une substance ou d'un revêtement. Le PDGF est un facteur de croissance reconnu pour favoriser la migration cellulaire [289] et il devrait être utilisé comme contrôle positif.

Nous avons évalué l'apoptose avec une coloration HOPI qui est plus précise que la coloration TUNEL [290]. Par contre, nous sous-estimons l'apoptose réelle, puisque les cellules

apoptotiques ou nécrotiques ont pu se décoller préalablement à la coloration et que nous regardons les cellules qui sont adhérentes à la surface. Nous avons utilisé une carence en facteurs de croissance, reconnue pour induire l'apoptose dans notre étude [291]. Il faudrait reproduire nos résultats en induisant l'apoptose d'une autre façon pour confirmer nos résultats, comme par hypoxie ou avec des LDL oxydés [292, 293]. L'utilisation des LDL oxydés pour provoquer l'apoptose est importante puisque les cellules dans la paroi anévrysmale sont exposées à ce facteur apoptotique caractéristique des plaques d'athérosclérose.

Dans notre étude, nous avons évalué la croissance cellulaire par un comptage cellulaire des cellules colorées par HOPI. Les résultats reflètent la prolifération cellulaire et de mort cellulaire. Un test qui met en évidence uniquement la prolifération soit par BrDU ou par un isotope radioactif comme la thymidine tritiée [192], devra être effectué pour pouvoir conclure sur les effets prolifératifs du PPE:N.

Finalement, nous avons regardé la présence des filaments d'actine présents dans les fibroblastes. Cette molécule est présente lorsque le fibroblaste se différencie en myofibroblastes, ce qui lui permet d'être contractile et d'aider à la contraction de la plaie. L'identification seule de l'actine est un bon indice de la différenciation cellulaire, mais n'est pas suffisante pour affirmer que nous sommes réellement en présence de myofibroblastes. Dans le futur, il faudrait tester d'autres anticorps, comme la vimentine ou la desmine, et regarder s'il y a formation de fibres de stress pour identifier le phénotype précis des fibroblastes qui se différencient sur le PPE:N et sur les surfaces en présence de CS. Il sera important de déterminer le phénotype des myofibroblastes puisqu'ils jouent un rôle central dans la réparation vasculaire et ils pourraient contracter

l'anévrisme et ainsi en réduire le diamètre. Il serait intéressant d'évaluer si le PPE:N peut augmenter la force tensile des myofibroblastes.

V-4-3-1 Biocompatibilité du PPE:N

Ce projet est la première étape d'un long processus de caractérisation de la réponse biologique au PPE:N. Plusieurs limites ne nous permettent pas encore de conclure sur la biocompatibilité du PPE:N. Le PPE:N a un potentiel très intéressant pour l'application des EC et nos résultats nous poussent à poursuivre dans notre investigation. Le PPE:N n'a induit aucune réaction indésirable sur les cellules que nous avons testées. La suite logique de ce projet serait ensuite d'effectuer des essais standardisés de cytotoxicité *in vitro* et *in vivo* selon les normes internationales établies (ASTM ou ISO) avec des fibroblastes L-929 reconnus pour ce type de test. Plusieurs étapes seront nécessaires pour éventuellement obtenir la permission par Santé Canada d'utiliser commercialement ce revêtement à des fins thérapeutiques.

V-4-3-2 Le potentiel du PPE:N pour la guérison vasculaire

L'ensemble des résultats nous laisse présumer que le revêtement de la surface par le PPE :N est une stratégie prometteuse pour une application sur les EC. Cependant, les essais de culture cellulaire ont de nombreuses limites et ne permettent pas d'extrapoler le comportement du revêtement *in vivo*. Le potentiel de ce revêtement devra être : 1) testé sur des membranes en PET réalistes 2) testé avec du sang humain pour évaluer sa thrombogénicité et l'influence possible de la formation d'un réseau de fibrine sur l'adhésion cellulaire à la surface du matériau 3) testé *in vivo*, notamment dans un modèle d'anévrisme, comme le modèle animal canin bilatéral

développé par l'équipe du Dre Lerouge [207]. Il reste plusieurs étapes avant que ce revêtement puisse être cliniquement utilisé.

V -5- Conclusion- Un avenir prometteur pour les EC

Les complications rencontrées dans l'utilisation clinique des EC limitent actuellement le traitement endovasculaire des anévrismes de l'aorte abdominale. Nous avons vu que ces complications peuvent être liées directement à la dégradation de l'implant, bien que ceci soit moins fréquent qu'avec les prothèses de 1^{ère} génération [269, 294]. Les fabricants d'EC continuent d'améliorer le design et la résistance à la corrosion de leur produit [295]. Le design et la qualité des biomatériaux utilisés ont été grandement améliorés avec la 2^{ème} génération EC. Le manque de guérison tissulaire que nous avons observé, même après plusieurs années d'implantation, peut être une cause importante des échecs rencontrés dans l'utilisation clinique des EC, ce qui est inquiétant pour les performances à long terme des EC [116, 117, 128, 296]. En plus, les patients qui sont traités avec les EC ont un suivi radiologique lourd et doivent aller voir leur médecin fréquemment.

Le développement d'EC avec un revêtement bioactif qui favoriserait la guérison biologique est une stratégie prometteuse. Elle ouvre la voie à une 3^{ème} génération d'EC, qui serait solidement ancrée, par fixation biologique, à la paroi aortique, comme le permet l'anastomose dans la chirurgie ouverte. Ceci permettrait de réduire les complications à moyen et long terme, et donc de traiter plus de patients par cette technologie minimalement invasive. Le PPE:N et la CS permettent l'amélioration de l'adhésion, de la migration, de la résistance à l'apoptose, de la croissance et de la différenciation cellulaire. Tous ces événements sont requis pour la formation

d'une néointima. Dans le contexte des AAA, la résistance à l'apoptose est une caractéristique primordiale, car les CMLV présentes de la paroi et qui pourraient participer à la formation d'un tissu fibreux, sont peu nombreuses. La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes est aussi un événement majeur, puisque c'est ce type cellulaire qui est central dans les processus de guérison. Sa présence peut améliorer grandement la formation de la néointima. Cependant, des modifications de surface de l'EC n'affecteront que les tissus à proximité et pourraient ne pas être suffisantes pour améliorer la guérison dans l'ensemble de l'anévrisme. La recolonisation de l'anévrisme par des CMLV saines, des fibroblastes [297, 298] ou des cellules souches injectées lors du traitement endovasculaire pourrait alors être une stratégie complémentaire.

BIBLIOGRAPHIES

1. Marieb EM. Anatomie et physiologie humaine. 2e ed. Saint-Laurent: Édition du Renouveau Pédagogique Inc (ERPI); 1999.
2. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Pathologic Basis of Disease. 6e ed. Philadelphia: Saunders; 1999.
3. Lindsay J, Hurst W. The aorta. New York: Grunes and Stratton Inc.; 1980.
4. Rouffy J. NJ. Artériopathies athéromateuses des membres inférieurs et de l'aorte abdominale. Paris: Masson; 1989.
5. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP1/POLY.Chp.2.html>
6. Karp G. Biologie cellulaire et moléculaire concepts et expériences. Paris: De Boeck Université; 1998.
7. <http://web.indstate.edu/thcme/mwking/extracellularmatrix.html>
8. <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/proteoglycan/PGA09E.html>.
9. Johnston KW, Rutherford RB, Tilson MD, Shah DM, Hollier L, Stanley JC. Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery. J Vasc Surg 1991;13(3):452-8.
10. Stehbens WE. Pathology and pathogenesis of degenerative atherosclerotic aneurysms. In Development of aneurysms. Keen RR and Dobrin PB, Eds. Eureka Edition, 2000: p84-125.
11. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Gordon IL, Chute EP, Littooy FN, et al. Relationship of age, gender, race, and body size to infrarenal aortic diameter. The Aneurysm Detection and Management (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. J Vasc Surg 1997;26(4):595-601.

12. Mortality results for randomised controlled trial of early elective surgery or ultrasonographic surveillance for small abdominal aortic aneurysms. The UK Small Aneurysm Trial Participants. *Lancet* 1998;352(9141):1649-55.
13. Dolmatch BL. and Blum U.. Stent-grafts: current clinical practice, Thieme Medical, 2000
14. Reed WW, Hallett JW, Jr., Damiano MA, Ballard DJ. Learning from the last ultrasound. A population-based study of patients with abdominal aortic aneurysm. *Arch Intern Med* 1997;157(18):2064-8.
15. Finlayson SR, Birkmeyer JD, Fillinger MF, Cronenwett JL. Should endovascular surgery lower the threshold for repair of abdominal aortic aneurysms? *J Vasc Surg* 1999;29(6):973-85.
16. Kniemeyer HW, Kessler T, Reber PU, Ris HB, Hakki H, Widmer MK. Treatment of ruptured abdominal aortic aneurysm, a permanent challenge or a waste of resources? Prediction of outcome using a multi-organ-dysfunction score. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;19(2):190-6.
17. Thompson MM. Controlling the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg* 2003;90(8):897-8.
18. Wilmink TB, Quick CR, Hubbard CS, Day NE. The influence of screening on the incidence of ruptured abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1999;30(2):203-8.
19. Bown MJ, Sutton AJ, Bell PR, Sayers RD. A meta-analysis of 50 years of ruptured abdominal aortic aneurysm repair. *Br J Surg* 2002;89(6):714-30.
20. Filipovic M, Goldacre MJ, Roberts SE, Yeates D, Duncan ME, Cook-Mozaffari P. Trends in mortality and hospital admission rates for abdominal aortic aneurysm in England and Wales, 1979-1999. *Br J Surg* 2005;92(8):968-75.
21. Heller JA, Weinberg A, Arons R, Krishnasastri KV, Lyon RT, Deitch JS, et al. Two decades of abdominal aortic aneurysm repair: have we made any progress? *J Vasc Surg* 2000;32(6):1091-100.
22. Ashton HA, Buxton MJ, Day NE, Kim LG, Marteau TM, Scott RA, et al. The Multicentre Aneurysm Screening Study (MASS) into the effect of abdominal aortic aneurysm screening on mortality in men: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360(9345):1531-9.

23. <http://www.hc-sc.gc.ca> (Santé Canada)
24. Di Martino ES, Vorp DA. Effect of variation in intraluminal thrombus constitutive properties on abdominal aortic aneurysm wall stress. *Ann Biomed Eng* 2003;31(7):804-9.
25. Melton LJ, 3rd, Bickerstaff LK, Hollier LH, Van Peenen HJ, Lie JT, Pairolero PC, et al. Changing incidence of abdominal aortic aneurysms: a population-based study. *Am J Epidemiol* 1984;120(3):379-86.
26. Kaufman JA, Geller SC, Brewster DC, Fan CM, Cambria RP, LaMuraglia GM, et al. Endovascular repair of abdominal aortic aneurysms: current status and future directions. *AJR Am J Roentgenol* 2000;175(2):289-302.
27. Newman AB, Arnold AM, Burke GL, O'Leary DH, Manolio TA. Cardiovascular disease and mortality in older adults with small abdominal aortic aneurysms detected by ultrasonography: the cardiovascular health study. *Ann Intern Med* 2001;134(3):182-90.
28. National Vital Statistics Reports: Deaths: Final Data for 1999, Vol 49. Hyattsville, Md: National Center for Health Statistics, Division of Vital Statistics, Centers for Disease Control (2001), 8.
29. Anderson RN. Deaths: leading causes for 2000. *Natl Vital Stat Rep* 2002;50(16):1-85.
30. Van Vlijmen-van Keulen CJ, Pals G, Rauwerda JA. Familial abdominal aortic aneurysm: a systematic review of a genetic background. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002;24(2):105-16.
31. Choke E, Cockerill G, Wilson WR, Sayed S, Dawson J, Loftus I, et al. A review of biological factors implicated in abdominal aortic aneurysm rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;30(3):227-44.
32. Tanabe T. Aortic Aneurysm: pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. Sapporo: Hokkaido University School of Medicine; 1993.
33. Singh K, Bonaa KH, Jacobsen BK, Bjork L, Solberg S. Prevalence of and risk factors for abdominal aortic aneurysms in a population-based study : The Tromso Study. *Am J Epidemiol* 2001;154(3):236-44.

34. Vardulaki KA, Walker NM, Day NE, Duffy SW, Ashton HA, Scott RA. Quantifying the risks of hypertension, age, sex and smoking in patients with abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg* 2000;87(2):195-200.
35. Erentug V, Bozbuga N, Omeroglu SN, Ardal H, Eren E, Guclu M, et al. Rupture of abdominal aortic aneurysms in Behcet's disease. *Ann Vasc Surg* 2003;17(6):682-5.
36. Matsumura K, Hirano T, Takeda K, Matsuda A, Nakagawa T, Yamaguchi N, et al. Incidence of aneurysms in Takayasu's arteritis. *Angiology* 1991;42(4):308-15.
37. Towbin JA, Casey B, Belmont J. The molecular basis of vascular disorders. *Am J Hum Genet* 1999;64(3):678-84.
38. Davies MJ. Aortic aneurysm formation: lessons from human studies and experimental models. *Circulation* 1998;98(3):193-5.
39. Powell JT, Bashir A, Dawson S, Vine N, Henney AM, Humphries SE, et al. Genetic variation on chromosome 16 is associated with abdominal aortic aneurysm. *Clin Sci (Lond)* 1990;78(1):13-6.
40. Tromp G, Wu Y, Prockop DJ, Madhatheri SL, Kleinert C, Earley JJ, et al. Sequencing of cDNA from 50 unrelated patients reveals that mutations in the triple-helical domain of type III procollagen are an infrequent cause of aortic aneurysms. *J Clin Invest* 1993;91(6):2539-45.
41. Schillinger M, Exner M, Mlekusch W, Domanovits H, Huber K, Mannhalter C, et al. Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with abdominal aortic aneurysm. *Thromb Res* 2002;106(2):131-6.
42. Reed D, Reed C, Stemmermann G, Hayashi T. Are aortic aneurysms caused by atherosclerosis? *Circulation* 1992;85(1):205-11.
43. Emmerich J, Bruneval p. L'athérosclérose. Paris: John Libbey Eurotext; 2000.
44. Anidjar S, Dobrin PB, Eichorst M, Graham GP, Chejfec G. Correlation of inflammatory infiltrate with the enlargement of experimental aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1992;16(2):139-47.
45. Hirose H, Tilson MD. Abdominal aortic aneurysm as an autoimmune disease. *Ann N Y Acad Sci* 2001;947:416-8.

46. Curci JA, Thompson RW. Adaptive cellular immunity in aortic aneurysms: cause, consequence, or context? *J Clin Invest* 2004;114(2):168-71.
47. Monte I, Capodanno D, Licciardi S, Ferraro C, Giannone MT, Grasso S, et al. The inflammatory abdominal aortic aneurysm and coronary artery disease. Case report and review. *Minerva Cardioangiol* 2006;54(2):265-71.
48. Wassef M, Baxter BT, Chisholm RL, Dalman RL, Fillinger MF, Heinecke J, et al. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: a multidisciplinary research program supported by the National Heart, Lung, and Blood Institute. *J Vasc Surg* 2001;34(4):730-8.
49. Gregory AK, Yin NX, Capella J, Xia S, Newman KM, Tilson MD. Features of autoimmunity in the abdominal aortic aneurysm. *Arch Surg* 1996;131(1):85-8.
50. Tambiah J, Powell JT. Chlamydia pneumoniae antigens facilitate experimental aortic dilatation: prevention with azithromycin. *J Vasc Surg* 2002;36(5):1011-7.
51. Hance KA, Tataria M, Ziporin SJ, Lee JK, Thompson RW. Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor. *J Vasc Surg* 2002;35(2):254-61.
52. Steinmetz EF, Buckley C, Thompson RW. Prospects for the medical management of abdominal aortic aneurysms. *Vasc Endovascular Surg* 2003;37(3):151-63.
53. Colonnello JS, Hance KA, Shames ML, Wyble CW, Ziporin SJ, Leidenfrost JE, et al. Transient exposure to elastase induces mouse aortic wall smooth muscle cell production of MCP-1 and RANTES during development of experimental aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2003;38(1):138-46.
54. Baxter BT, McGee GS, Shively VP, Drummond IA, Dixit SN, Yamauchi M, et al. Elastin content, cross-links, and mRNA in normal and aneurysmal human aorta. *J Vasc Surg* 1992;16(2):192-200.
55. Sakalihasan N, Heyeres A, Nusgens BV, Limet R, Lapiere CM. Modifications of the extracellular matrix of aneurysmal abdominal aortas as a function of their size. *Eur J Vasc Surg* 1993;7(6):633-7.
56. Dobrin PB, Mrkvicka R. Failure of elastin or collagen as possible critical connective tissue alterations underlying aneurysmal dilatation. *Cardiovasc Surg* 1994;2(4):484-8.

57. Losy F, Dai J, Pages C, Ginat M, Muscatelli-Groux B, Guinault AM, et al. Paracrine secretion of transforming growth factor-beta1 in aneurysm healing and stabilization with endovascular smooth muscle cell therapy. *J Vasc Surg* 2003;37(6):1301-9.
58. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 1995;77(5):863-8.
59. McMillan WD, Patterson BK, Keen RR, Shively VP, Cipollone M, Pearce WH. In situ localization and quantification of mRNA for 92-kD type IV collagenase and its inhibitor in aneurysmal, occlusive, and normal aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(8):1139-44.
60. Yamashita A, Noma T, Nakazawa A, Saito S, Fujioka K, Zempo N, et al. Enhanced expression of matrix metalloproteinase-9 in abdominal aortic aneurysms. *World J Surg* 2001;25(3):259-65.
61. McMillan WD, Pearce WH. Increased plasma levels of metalloproteinase-9 are associated with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1999;29(1):122-7; discussion 127-9.
62. Lindholt JS, Vammen S, Fasting H, Henneberg EW, Heickendorff L. The plasma level of matrix metalloproteinase 9 may predict the natural history of small abdominal aortic aneurysms. A preliminary study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;20(3):281-5.
63. Curci JA, Liao S, Huffman MD, Shapiro SD, Thompson RW. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 1998;102(11):1900-10.
64. Rowe VL, Stevens SL, Reddick TT, Freeman MB, Donnell R, Carroll RC, et al. Vascular smooth muscle cell apoptosis in aneurysmal, occlusive, and normal human aortas. *J Vasc Surg* 2000;31(3):567-76.
65. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, et al. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 1992;19(2):267-74.

66. Lopez-Candales A, Holmes DR, Liao S, Scott MJ, Wickline SA, Thompson RW. Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. *Am J Pathol* 1997;150(3):993-1007.
67. Jacob T, Ascher E, Hingorani A, Gunduz Y, Kallakuri S. Initial steps in the unifying theory of the pathogenesis of artery aneurysms. *J Surg Res* 2001;101(1):37-43.
68. Cailhier JF, Laplante P, Hebert MJ. Endothelial apoptosis and chronic transplant vasculopathy: recent results, novel mechanisms. *Am J Transplant* 2006;6(2):247-53.
69. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5(11):897-907.
70. Henderson EL, Geng YJ, Sukhova GK, Whittemore AD, Knox J, Libby P. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 1999;99(1):96-104.
71. Shah PK. Inflammation, metalloproteinases, and increased proteolysis: an emerging pathophysiological paradigm in aortic aneurysm. *Circulation* 1997;96(7):2115-7.
72. Allaire E, Muscatelli-Groux B, Mandet C, Guinault AM, Bruneval P, Desgranges P, et al. Paracrine effect of vascular smooth muscle cells in the prevention of aortic aneurysm formation. *J Vasc Surg* 2002;36(5):1018-26.
73. Yip TH, Yu SCM. Cyclic transition to turbulence in rigid abdominal aortic aneurysm models. *Fluid Dynamics Research* 2001;26:81-113.
74. Takagi H, Yoshikawa S, Mizuno Y, Matsuno Y, Umeda Y, Fukumoto Y, et al. Intrathrombotic pressure of a thrombosed abdominal aortic aneurysm. *Ann Vasc Surg* 2005;19(1):108-12.
75. Vorp DA, Wang DH, Webster MW, Federspiel WJ. Effect of intraluminal thrombus thickness and bulge diameter on the oxygen diffusion in abdominal aortic aneurysm. *J Biomech Eng* 1998;120(5):579-83.

76. Fontaine V, Jacob MP, Houard X, Rossignol P, Plissonnier D, Angles-Cano E, et al. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol* 2002;161(5):1701-10.
77. Stenbaek J, Kalin B, Swedenborg J. Growth of thrombus may be a better predictor of rupture than diameter in patients with abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;20(5):466-9.
78. Sakalihasan N, Delvenne P, Nussgens BV, Limet R, Lapiere CM. Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1996;24(1):127-33.
79. Rose J. Stent-grafts for unruptured abdominal aortic aneurysms: current status. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2006;29(3):332-43.
80. Cambria RP, Brewster DC, Abbott WM, L'Italien GJ, Megerman JJ, LaMuraglia GM, et al. The impact of selective use of dipyridamole-thallium scans and surgical factors on the current morbidity of aortic surgery. *J Vasc Surg* 1992;15(1):43-50; discussion 51.
81. Dardik A, Lin JW, Gordon TA, Williams GM, Perler BA. Results of elective abdominal aortic aneurysm repair in the 1990s: A population-based analysis of 2335 cases. *J Vasc Surg* 1999;30(6):985-95.
82. Melton LJ, 3rd, Bickerstaff LK, Hollier LH, Van Peenen HJ, Lie JT, Pairolero PC, et al. Changing incidence of abdominal aortic aneurysms: a population-based study. *Am J Epidemiol* 1984;120(3):379-86.
83. Geraghty PJ, Sicard GA. Abdominal aortic aneurysm repair in high-risk and elderly patients. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2003;44(4):543-7.
84. Mortality results for randomised controlled trial of early elective surgery or ultrasonographic surveillance for small abdominal aortic aneurysms. The UK Small Aneurysm Trial Participants. *Lancet* 1998;352(9141):1649-55.

85. Lederle FA, Wilson SE, Johnson GR, Reinke DB, Littooy FN, Acher CW, et al. Immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med* 2002;346(19):1437-44.
86. Parodi JC, Palmaz JC, Barone HD. Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 1991;5(6):491-9.
87. Uflacker R, Robison J. Endovascular treatment of abdominal aortic aneurysms: a review. *Eur Radiol* 2001;11(5):739-53.
88. Clair DG, Gray B, O'Hara P J, Ouriel K. An evaluation of the costs to health care institutions of endovascular aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 2000;32(1):148-52.
89. May J, White GH, Waugh R, Ly CN, Stephen MS, Jones MA, et al. Improved survival after endoluminal repair with second-generation prostheses compared with open repair in the treatment of abdominal aortic aneurysms: a 5-year concurrent comparison using life table method. *J Vasc Surg* 2001;33(2 Suppl):S21-6.
90. Arko FR, Hill BB, Reeves TR, Olcott C, Harris EJ, Fogarty TJ, et al. Early and late functional outcome assessments following endovascular and open aneurysm repair. *J Endovasc Ther* 2003;10(1):2-9.
91. Greenhalgh RM, Brown LC, Kwong GP, Powell JT, Thompson SG. Comparison of endovascular aneurysm repair with open repair in patients with abdominal aortic aneurysm (EVAR trial 1), 30-day operative mortality results: randomised controlled trial. *Lancet* 2004;364(9437):843-8.
92. Prinssen M, Verhoeven EL, Buth J, Cuypers PW, van Sambeek MR, Balm R, Buskens E, Grobbee DE, Blankensteijn JD; Dutch Randomized Endovascular Aneurysm Management (DREAM) Trial Group. A randomized trial comparing conventional and endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med*. 2004; 351(16):1607-18.
93. Brandt M, Walluscheck KP, Jahnke T, Attmann T, Heller M, Cremer J, et al. Mid-term results after endovascular stent-grafting of descending aortic aneurysms in high-risk patients. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2006;29(5):739-44.

94. Brewster DC, Jones JE, Chung TK, Lamuraglia GM, Kwolek CJ, Watkins MT, et al. Long-term Outcomes After Endovascular Abdominal Aortic Aneurysm Repair: The First Decade. *Ann Surg* 2006;244(3):426-38.
95. May J, White GH, Yu W, Ly CN, Waugh R, Stephen MS, et al. Concurrent comparison of endoluminal versus open repair in the treatment of abdominal aortic aneurysms: analysis of 303 patients by life table method. *J Vasc Surg* 1998;27(2):213-20; discussion 220-1.
96. Moore WS, Kashyap VS, Vescera CL, Quinones-Baldrich WJ. Abdominal aortic aneurysm: a 6-year comparison of endovascular versus transabdominal repair. *Ann Surg* 1999;230(3):298-306; discussion 306-8.
97. Brewster DC. Presidential address: what would you do if it were your father? Reflections on endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 2001;33(6):1139-47.
98. Matsumura JS, Brewster DC, Makaroun MS, Naftel DC. A multicenter controlled clinical trial of open versus endovascular treatment of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2003;37(2):262-71.
99. Kent KC, Hollenbeck S, Anderson PL. Is Evar Yhe Neaw Gold Standard? A review of the current states of EVAR and open repair. *Supplement to Endovasculaire today* 2004(July):3-11.
100. Elkouri S, Gloviczki P, McKusick MA, Panneton JM, Andrews J, Bower TC, et al. Perioperative complications and early outcome after endovascular and open surgical repair of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2004;39(3):497-505.
101. Rutherford RB, Krupski WC. Current status of open versus endovascular stent-graft repair of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2004;39(5):1129-39.
102. Lee WA, Carter JW, Upchurch G, Seeger JM, Huber TS. Perioperative outcomes after open and endovascular repair of intact abdominal aortic aneurysms in the United States during 2001. *J Vasc Surg* 2004;39(3):491-6.
103. Schmittling ZC, McLafferty RB, Danetz JS, Ramsey DE, Hodgson KJ. The AneuRx modular endograft device for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Overview of 7 years of clinical use. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2004;45(4):301-6.

104. Soulez G, Therasse E, Monfared AA, Blair JF, Choiniere M, Elkouri S, et al. Pain and quality of life assessment after endovascular versus open repair of abdominal aortic aneurysms in patients at low risk. *J Vasc Interv Radiol* 2005;16(8):1093-100.
105. Galle C, De Maertelaer V, Motte S, Zhou L, Stordeur P, Delville JP, et al. Early inflammatory response after elective abdominal aortic aneurysm repair: a comparison between endovascular procedure and conventional surgery. *J Vasc Surg* 2000;32(2):234-46.
106. Sweeney KJ, Evoy D, Sultan S, Coates C, Moore DJ, Shanik DG, et al. Endovascular approach to abdominal aortic aneurysms limits the postoperative systemic immune response. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002;23(4):303-8.
107. Norgren L, Swartbol P. Biological responses to endovascular treatment of abdominal aortic aneurysms. *J Endovasc Surg* 1997;4(2):169-73.
108. Morikage N, Esato K, Zenpo N, Fujioka K, Takenaka H. Is endovascular treatment of abdominal aortic aneurysms less invasive regarding the biological responses? *Surg Today* 2000;30(2):142-6.
109. Biebl M, Hakaim AG, Oldenburg WA, Lau LL, Klocker J, Neuhauser B, et al. Midterm results of a single-center experience with commercially available devices for endovascular aneurysm repair. *Mt Sinai J Med* 2005;72(2):127-35.
110. Van Marrewijk CJ, Leurs LJ, Vallabhaneni SR, Harris PL, Buth J, Laheij RJ. Risk-adjusted outcome analysis of endovascular abdominal aortic aneurysm repair in a large population: how do stent-grafts compare? *J Endovasc Ther* 2005;12(4):417-29.
111. Ahn SS, Rutherford RB, Johnston KW, May J, Veith FJ, Baker JD, et al. Reporting standards for infrarenal endovascular abdominal aortic aneurysm repair. Ad Hoc Committee for Standardized Reporting Practices in Vascular Surgery of The Society for Vascular Surgery/International Society for Cardiovascular Surgery. *J Vasc Surg* 1997;25(2):405-10.
112. Greenberg RK, Chuter TA, Sternbergh WC, 3rd, Fearnot NE. Zenith AAA endovascular graft: intermediate-term results of the US multicenter trial. *J Vasc Surg* 2004;39(6):1209-18.

113. Ellozy SH, Carroccio A, Lookstein RA, Jacobs TS, Addis MD, Teodorescu VJ, et al. Abdominal aortic aneurysm sac shrinkage after endovascular aneurysm repair: correlation with chronic sac pressure measurement. *J Vasc Surg* 2006;43(1):2-7.
114. Fransen GA, Vallabhaneni SR, Sr., van Marrewijk CJ, Laheij RJ, Harris PL, Buth J. Rupture of infra-renal aortic aneurysm after endovascular repair: a series from EUROSTAR registry. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003;26(5):487-93.
115. Schermerhorn ML, Finlayson SR, Fillinger MF, Buth J, van Marrewijk C, Cronenwett JL. Life expectancy after endovascular versus open abdominal aortic aneurysm repair: results of a decision analysis model on the basis of data from EUROSTAR. *J Vasc Surg* 2002;36(6):1112-20.
116. Brewster DC, Cronenwett JL, Hallett JW, Jr., Johnston KW, Krupski WC, Matsumura JS. Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Report of a subcommittee of the Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg* 2003;37(5):1106-17.
117. Dias NV, Ivancev K, Malina M, Resch T, Lindblad B, Sonesson B. Does the wide application of endovascular AAA repair affect the results of open surgery? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003;26(2):188-94.
118. Krohg-Sorensen K, Hafsahl G, Fosse E, Geiran OR. Acceptable short-term results after endovascular repair of diseases of the thoracic aorta in high risk patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003;24(3):379-87.
119. Al-Omran M, Verma S, Lindsay TF, Weisel RD, Sternbach Y. Clinical decision making for endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. *Circulation* 2004;110(23):e517-23.
120. Minor ME, Ellozy S, Carroccio A, Oak J, Chae K, Agarwal G, et al. Endovascular aortic aneurysm repair in the octogenarian: is it worthwhile? *Arch Surg* 2004;139(3):308-14.
121. Subramanian K, Woodburn KR, Travis SJ, Hancock J. Secondary interventions following endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. *Diagn Interv Radiol* 2006;12(2):99-104.

122. Laheij RJ, Buth J, Harris PL, Moll FL, Stelter WJ, Verhoeven EL. Need for secondary interventions after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. Intermediate-term follow-up results of a European collaborative registry (EUROSTAR). *Br J Surg* 2000;87(12):1666-73.
123. Sampram ES, Karafa MT, Mascha EJ, Clair DG, Greenberg RK, Lyden SP, et al. Nature, frequency, and predictors of secondary procedures after endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2003;37(5):930-7.
124. Lee WA, Huber TS, Seeger JM. Late type III endoleak from graft erosion of an Excluder stent graft: a case report. *J Vasc Surg* 2006;44(1):183-5.
125. Becquemin JP, Kelley L, Zubilewicz T, Desgranges P, Lapeyre M, Kobeiter H. Outcomes of secondary interventions after abdominal aortic aneurysm endovascular repair. *J Vasc Surg* 2004;39(2):298-305.
126. Albertini JN, Lahlou Z, Magnan PE, Branchereau A. Endovascular repair of abdominal aortic aneurysms with a unibody stent-graft: 3-year results of the French Powerlink Multicenter Trial. *J Endovasc Ther* 2005;12(6):629-37.
127. Kaufman JA, Geller SC, Brewster DC, Fan CM, Cambria RP, LaMuraglia GM, et al. Endovascular repair of abdominal aortic aneurysms: current status and future directions. *AJR Am J Roentgenol* 2000;175(2):289-302.
128. Dattilo JB, Brewster DC, Fan CM, Geller SC, Cambria RP, Lamuraglia GM, et al. Clinical failures of endovascular abdominal aortic aneurysm repair: incidence, causes, and management. *J Vasc Surg* 2002;35(6):1137-44.
129. Aho PS, Roth WD, Keto P, Lepantalo M. Early elective conversion for failing EVAR. *Scand J Surg* 2005;94(3):221-6.
130. Tiesenhausen K, Hessinger M, Konstantiniuk P, Tomka M, Baumann A, Thalhammer M, et al. Surgical conversion of abdominal aortic stent-grafts--outcome and technical considerations. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006;31(1):36-41.

131. Harris PL, Vallabhaneni SR, Desgranges P, Becquemin JP, van Marrewijk C, Laheij RJ. Incidence and risk factors of late rupture, conversion, and death after endovascular repair of infrarenal aortic aneurysms: the EUROSTAR experience. European Collaborators on Stent/graft techniques for aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 2000;32(4):739-49.
132. Guidoin R, Marois Y, Douville Y, King MW, Castonguay M, Traore A, et al. First-generation aortic endografts: analysis of explanted Stentor devices from the EUROSTAR Registry. *J Endovasc Ther* 2000;7(2):105-22.
133. Jacobs TS, Won J, Gravereaux EC, Faries PL, Morrissey N, Teodorescu VJ, et al. Mechanical failure of prosthetic human implants: a 10-year experience with aortic stent graft devices. *J Vasc Surg* 2003;37(1):16-26.
134. Chakfe N, Dieval F, Riepe G, Mathieu D, Zbali I, Thaveau F, et al. Influence of the textile structure on the degradation of explanted aortic endoprostheses. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;27(1):33-41.
135. Harris P, Brennan J, Martin J, Gould D, Bakran A, Gilling-Smith G, et al. Longitudinal aneurysm shrinkage following endovascular aortic aneurysm repair: a source of intermediate and late complications. *J Endovasc Surg* 1999;6(1):11-6.
136. Chong CK, How TV. Flow patterns in an endovascular stent-graft for abdominal aortic aneurysm repair. *J Biomech* 2004;37(1):89-97.
137. Canic S, Ravi-Chandar K, Krajcer Z, Mirkovic D, Lapin S. Mathematical Model analysis of Wallstent and Aneurx: dynamic responses of bare-metal endoprosthesis compared with those of stent-graft. *Tex Heart Inst J* 2005;32(4):502-6.
138. Heintz C, Riepe G, Birken L, Kaiser E, Chakfe N, Morlock M, et al. Corroded nitinol wires in explanted aortic endografts: an important mechanism of failure? *J Endovasc Ther* 2001;8(3):248-53.

139. Carpenter JP, Anderson WN, Brewster DC, Kwolek C, Makaroun M, Martin J, et al. Multicenter pivotal trial results of the Lifepath System for endovascular aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 2004;39(1):34-43.
140. Trepanier C, Tabrizian M, Yahia LH, Bilodeau L, Piron DL. Effect of modification of oxide layer on NiTi stent corrosion resistance. *J Biomed Mater Res* 1998;43(4):433-40.
141. Thierry B, Merhi Y, Bilodeau L, Trepanier C, Tabrizian M. Nitinol versus stainless steel stents: acute thrombogenicity study in an ex vivo porcine model. *Biomaterials* 2002;23(14):2997-3005.
142. Lerouge S, Guidoin R, Ashton T, Guidoin M-F, Legrand A-P, Douville Y, et al. Nitinol self-deployable endovascular prostheses: Variability in corrosion resistance. *Annales de Chimie: Science des Materiaux* 2004;29(1):41-52.
143. Leon LR, Jr., Rodriguez HE. Aortic endograft migration. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther* 2005;17(4):363-73.
144. Sampaio SM, Panneton JM, Mozes G, Andrews JC, Noel AA, Kalra M, et al. AneuRx device migration: incidence, risk factors, and consequences. *Ann Vasc Surg* 2005;19(2):178-85.
145. Zarins CK. The US AneuRx Clinical Trial: 6-year clinical update 2002. *J Vasc Surg* 2003;37(4):904-8.
146. Mohan IV, Harris PL, Van Marrewijk CJ, Laheij RJ, How TV. Factors and forces influencing stent-graft migration after endovascular aortic aneurysm repair. *J Endovasc Ther* 2002;9(6):748-55.
147. Kalliafas S, Albertini JN, Macierewicz J, Yusuf SW, Whitaker SC, Davidson I, et al. Stent-graft migration after endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. *J Endovasc Ther* 2002;9(6):743-7.
148. Napoli V, Sardella SG, Bargellini I, Petruzzi P, Cioni R, Vignali C, et al. Evaluation of the proximal aortic neck enlargement following endovascular repair of abdominal aortic aneurysm: 3-years experience. *Eur Radiol* 2003;13(8):1962-71.

149. England A, Butterfield JS, Jones N, McCollum CN, Nasim A, Welch M, et al. Device migration after endovascular abdominal aortic aneurysm repair: experience with a talent stent-graft. *J Vasc Interv Radiol* 2004;15(12):1399-405.
150. Heikkinen MA, Alsac JM, Arko FR, Metsanoja R, Zvaigzne A, Zarins CK. The importance of iliac fixation in prevention of stent graft migration. *J Vasc Surg* 2006;43(6):1130-7; discussion 1137.
151. Conners MS, Sternbergh WC, Carter G, Tonnessen BH, Yoselevitz M, Money SR. Endograft migration one to four years after endovascular abdominal aortic aneurysm repair with the AneuRx device: a cautionary note. *J Vasc Surg* 2002;36(3):476-84.
152. Zarins CK, Bloch DA, Crabtree T, Matsumoto AH, White RA, Fogarty TJ. Stent graft migration after endovascular aneurysm repair: importance of proximal fixation. *J Vasc Surg* 2003;38(6):1264-72; discussion 1272.
153. Malina M, Lindblad B, Ivancev K, Lindh M, Malina J, Brunkwall J. Endovascular AAA exclusion: will stents with hooks and barbs prevent stent-graft migration? *J Endovasc Surg* 1998;5(4):310-7.
154. Malina M, Brunkwall J, Ivancev K, Jonsson J, Malina J, Lindblad B. Endovascular healing is inadequate for fixation of Dacron stent-grafts in human aortoiliac vessels. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;19(1):5-11.
155. Resch T, Malina M, Lindblad B, Malina J, Brunkwall J, Ivancev K. The impact of stent design on proximal stent-graft fixation in the abdominal aorta: an experimental study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;20(2):190-5.
156. White GH, Yu W, May J, Chaufour X, Stephen MS. Endoleak as a complication of endoluminal grafting of abdominal aortic aneurysms: classification, incidence, diagnosis, and management. *J Endovasc Surg* 1997;4(2):152-68.
157. Schurink GW, Aarts NJ, van Bockel JH. Endoleak after stent-graft treatment of abdominal aortic aneurysm: a meta-analysis of clinical studies. *Br J Surg* 1999;86(5):581-7.
158. Buth J, Laheij RJ. Early complications and endoleaks after endovascular abdominal aortic aneurysm repair: report of a multicenter study. *J Vasc Surg* 2000;31(1 Pt 1):134-46.

159. Petrik PV, Moore WS. Endoleaks following endovascular repair of abdominal aortic aneurysm: the predictive value of preoperative anatomic factors--a review of 100 cases. *J Vasc Surg* 2001;33(4):739-44.
160. Fan CM, Rafferty EA, Geller SC, Kaufman JA, Brewster DC, Cambria RP, et al. Endovascular stent-graft in abdominal aortic aneurysms: the relationship between patent vessels that arise from the aneurysmal sac and early endoleak. *Radiology* 2001;218(1):176-82.
161. Veith FJ, Baum RA, Ohki T, Amor M, Adiseshiah M, Blankensteijn JD, et al. Nature and significance of endoleaks and endotension: summary of opinions expressed at an international conference. *J Vasc Surg* 2002;35(5):1029-35.
162. Elkouri S, Gloviczki P, McKusick MA, Panneton JM, Andrews JC, Bower TC, et al. Endovascular repair of abdominal aortic aneurysms: initial experience with 100 consecutive patients. *Mayo Clin Proc* 2003;78(10):1234-42.
163. Greenberg RK, Deaton D, Sullivan T, Walker E, Lyden SP, Srivastava SD, et al. Variable sac behavior after endovascular repair of abdominal aortic aneurysm: analysis of core laboratory data. *J Vasc Surg* 2004;39(1):95-101.
164. Sukhija R, Aronow WS, Mathew J, Yalamanchili K, Kakar P, Frishman WH, et al. Treatment of abdominal aortic aneurysms with an endovascular stent-graft prosthesis in 96 high-risk patients. *Cardiol Rev* 2005;13(4):165-6.
165. Van Marrewijk CJ, Fransen G, Laheij RJ, Harris PL, Buth J. Is a type II endoleak after EVAR a harbinger of risk? Causes and outcome of open conversion and aneurysm rupture during follow-up. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;27(2):128-37.
166. Steinmetz E, Rubin BG, Sanchez LA, Choi ET, Geraghty PJ, Baty J, et al. Type II endoleak after endovascular abdominal aortic aneurysm repair: a conservative approach with selective intervention is safe and cost-effective. *J Vasc Surg* 2004;39(2):306-13.
167. Greenberg R, Fairman R, Srivastava S, Criado F, Green R. Endovascular grafting in patients with short proximal necks: an analysis of short-term results. *Cardiovasc Surg* 2000;8(5):350-4.

168. Laheij RJ, van Marrewijk CJ. Endovascular stenting of abdominal aortic aneurysm in patients unfit for elective open surgery. Eurostar group. EUROpean collaborators registry on Stent-graft Techniques for abdominal aortic Aneurysm Repair. *Lancet* 2000;356(9232):832.
169. Baum RA, Stavropoulos SW, Fairman RM, Carpenter JP. Endoleaks after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Interv Radiol* 2003;14(9 Pt 1):1111-7.
170. Albertini JN, Macierewicz JA, Yusuf SW, Wenham PW, Hopkinson BR. Pathophysiology of proximal perigraft endoleak following endovascular repair of abdominal aortic aneurysms: a study using a flow model. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001;22(1):53-6.
171. Armon MP, Yusuf SW, Whitaker SC, Gregson RH, Wenham PW, Hopkinson BR. Thrombus distribution and changes in aneurysm size following endovascular aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1998;16(6):472-6.
172. Gilling-Smith G, Brennan J, Harris P, Bakran A, Gould D, McWilliams R. Endotension after endovascular aneurysm repair: definition, classification, and strategies for surveillance and intervention. *J Endovasc Surg* 1999;6(4):305-7.
173. White GH, May J. How should endotension be defined? History of a concept and evolution of a new term. *J Endovasc Ther* 2000;7(6):435-8; discussion 439-40.
174. Dayal R, Mousa A, Bernheim J, Hollenbeck S, Henderson P, Prince M, et al. Characterization of retrograde collateral (type II) endoleak using a new canine model. *J Vasc Surg* 2004;40(5):985-94.
175. Timaran CH, Ohki T, Rhee SJ, Veith FJ, Gargiulo NJ, 3rd, Toriumi H, et al. Predicting aneurysm enlargement in patients with persistent type II endoleaks. *J Vasc Surg* 2004;39(6):1157-62.
176. Gelfand DV, White GH, Wilson SE. Clinical significance of type II endoleak after endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. *Ann Vasc Surg* 2006;20(1):69-74.
177. Riepe G, Heilberger P, Umscheid T, Chakfe N, Raithel D, Stelter W, et al. Frame dislocation of body middle rings in endovascular stent tube grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999;17(1):28-34.
178. Riepe G, Heintz C, Kaiser E, Chakfe N, Morlock M, Delling M, et al. What can we learn from explanted endovascular devices? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002;24(2):117-22.

179. Zarins CK, Arko FR, Crabtree T, Bloch DA, Ouriel K, Allen RC, et al. Explant analysis of AneuRx stent grafts: relationship between structural findings and clinical outcome. *J Vasc Surg* 2004;40(1):1-11.
180. McArthur C, Teodorescu V, Eisen L, Morrissey N, Faries P, Hollier L, et al. Histopathologic analysis of endovascular stent grafts from patients with aortic aneurysms: Does healing occur? *J Vasc Surg* 2001;33(4):733-8.
181. White RA, Walot I, Donayre CE, Woody J, Kopchok GE. Failed AAA endograft exclusion due to type II endoleak: explant analysis. *J Endovasc Ther* 2001;8(3):254-61.
182. Szilagyi DE. The problem of healing of endovascular stent grafts in the repair of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2001;33(6):1283-5.
183. Wieslander CK, Huang CC, Omura MC, Ahn SS. Endovascular workforce for peripheral vascular disease: current and future needs. *J Vasc Surg* 2002;35(6):1218-25.
184. Reichart M, Geelkerken RH, Huisman AB, van Det RJ, de Smit P, Volker EP. Ruptured abdominal aortic aneurysm: endovascular repair is feasible in 40% of patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003;26(5):479-86.
185. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(5):349-63.
186. Pollman MJ, Hall JL, Mann MJ, Zhang L, Gibbons GH. Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nat Med* 1998;4(2):222-7.
187. Diez J, Fortuno MA, Zalba G, Etayo JC, Fortuno A, Ravassa S, et al. Altered regulation of smooth muscle cell proliferation and apoptosis in small arteries of spontaneously hypertensive rats. *Eur Heart J* 1998;19 Suppl G:G29-33..
188. Malik N, Francis SE, Holt CM, Gunn J, Thomas GL, Shepherd L, et al. Apoptosis and cell proliferation after porcine coronary angioplasty. *Circulation* 1998;98(16):1657-65.
189. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 2003;302(5651):1704-9.

190. Guevara NV, Kim HS, Antonova EI, Chan L. The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. *Nat Med* 1999;5(3):335-9.
191. Li G, Chen SJ, Oparil S, Chen YF, Thompson JA. Direct in vivo evidence demonstrating neointimal migration of adventitial fibroblasts after balloon injury of rat carotid arteries. *Circulation* 2000;101(12):1362-5.
192. Wilcox JN, Okamoto EI, Nakahara KI, Vinten-Johansen J. Perivascular responses after angioplasty which may contribute to postangioplasty restenosis: a role for circulating myofibroblast precursors? *Ann N Y Acad Sci* 2001;947:68-90; discussion 90-2.
193. Skalli O, Schurch W, Seemayer T, Lagace R, Montandon D, Pittet B, et al. Myofibroblasts from diverse pathologic settings are heterogeneous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. *Lab Invest* 1989;60(2):275-85.
194. Clark RA. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci* 1993;306(1):42-8.
195. Scott SM, Barth MG, Gaddy LR, Ahl ET, Jr. The role of circulating cells in the healing of vascular prostheses. *J Vasc Surg* 1994;19(4):585-93.
196. Tepper OM, Sealove BA, Murayama T, Asahara T. Newly emerging concepts in blood vessel growth: recent discovery of endothelial progenitor cells and their function in tissue regeneration. *J Invest Med* 2003;51(6):353-9.
197. Hegner B, Weber M, Dragun D, Schulze-Lohoff E. Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Hypertens* 2005;23(6):1191-202.
198. Galmiche MC, Koteliensky VE, Briere J, Herve P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood* 1993;82(1):66-76.
199. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85(3):221-8.

200. Krohg-Sorensen K, Brekke M, Drolsum A, Kvernebo K. Periprosthetic leak and rupture after endovascular repair of abdominal aortic aneurysm: the significance of device design for long-term results. *J Vasc Surg* 1999;29(6):1152-8.
201. Lambert AW, Budd JS, Fox AD, Potter U, Rooney N, Horrocks M. The incorporation of a stent-graft into the porcine aorta and the inflammatory response to the endoprosthesis. *Cardiovasc Surg* 1999;7(7):710-4.
202. Adolph R, Vorp DA, Steed DL, Webster MW, Kameneva MV, Watkins SC. Cellular content and permeability of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 1997;25(5):916-26.
203. Salzmann DL, Kleinert LB, Berman SS, Williams SK. Inflammation and neovascularization associated with clinically used vascular prosthetic materials. *Cardiovasc Pathol* 1999;8(2):63-71.
204. Jeschke MG, Hermanutz V, Wolf SE, Koveker GB. Polyurethane vascular prostheses decreases neointimal formation compared with expanded polytetrafluoroethylene. *J Vasc Surg* 1999;29(1):168-76.
205. Salacinski HJ, Goldner S, Giudiceandrea A, Hamilton G, Seifalian AM, Edwards A, et al. The mechanical behavior of vascular grafts: a review. *J Biomater Appl* 2001;15(3):241-78.
206. Ratner BD. Reducing capsular thickness and enhancing angiogenesis around implant drug release systems. *J Control Release* 2002;78(1-3):211-8.
207. Lerouge S, Raymond J, Salazkin I, Qin Z, Gaboury L, Cloutier G, et al. Endovascular aortic aneurysm repair with stent-grafts: experimental models can reproduce endoleaks. *J Vasc Interv Radiol* 2004;15(9):971-9..
208. Lerouge S, Raymond J, Schloesser K, Gaboury L, Soulez G. Effect of radioactivity on stent-graft incorporation after endovascular treatment of aneurysms: An animal study. *J Biomed Mater Res A* 2006.
209. Marty B, Leu AJ, Mucciolo A, von Segesser LK. Biologic fixation of polyester- versus polyurethane-covered stents in a porcine model. *J Vasc Interv Radiol* 2002;13(6):601-7.

210. Van der Bas JM, Quax PH, van den Berg AC, van Hinsbergh VW, van Bockel JH. Ingrowth of aorta vascular cells into basic fibroblast growth factor-impregnated vascular prosthesis material: a porcine and human in vitro study on blood vessel prosthesis healing. *J Vasc Surg* 2002;36(6):1237-47.
211. Van der Bas JM, Quax PH, van den Berg AC, Visser MJ, van der Linden E, van Bockel JH. Ingrowth of aorta wall into stent grafts impregnated with basic fibroblast growth factor: a porcine in vivo study of blood vessel prosthesis healing. *J Vasc Surg* 2004;39(4):850-8.
212. McCaffrey TA, Consigli S, Du B, Falcone DJ, Sanborn TA, Spokojny AM, et al. Decreased type II/type I TGF-beta receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions. Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF-beta1. *J Clin Invest* 1995;96(6):2667-75.
213. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004;84(3):767-801.
214. Raines EW. PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15(4):237-54.
215. Ombrellaro MP, Stevens SL, Schaeffer DO, Freeman MB, Sciarrotta J, Carroll R, et al. The role of platelet-derived growth factor in intraluminal stented graft healing. *J Am Coll Surg* 1997;184(1):49-57.
216. Marois Y, Cadi R, Gourdon J, Fatouraee N, King MW, Zhang Z, et al. Biostability, inflammatory response, and healing characteristics of a fluoropassivated polyester-knit mesh in the repair of experimental abdominal hernias. *Artif Organs* 2000;24(7):533-43.
217. Ma Z, He W, Yong T, Ramakrishna S. Grafting of gelatin on electrospun poly(caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell Orientation. *Tissue Eng* 2005;11(7-8):1149-58.
218. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 1984;309(5963):30-3.
219. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:697-715.

220. Lee MH, Brass DA, Morris R, Composto RJ, Ducheyne P. The effect of non-specific interactions on cellular adhesion using model surfaces. *Biomaterials* 2005;26(14):1721-30.
221. Lieb E, Hacker M, Tessmar J, Kunz-Schughart LA, Fiedler J, Dahmen C, et al. Mediating specific cell adhesion to low-adhesive diblock copolymers by instant modification with cyclic RGD peptides. *Biomaterials* 2005;26(15):2333-41.
222. Buckley CD, Pilling D, Henriquez NV, Parsonage G, Threlfall K, Scheel-Toellner D, et al. RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. *Nature* 1999;397(6719):534-9.
223. Bix G, Fu J, Gonzalez EM, Macro L, Barker A, Campbell S, et al. Endorepellin causes endothelial cell disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions through $\alpha 2 \beta 1$ integrin. *J Cell Biol* 2004;166(1):97-109.
224. Bix G, Iozzo RV. Matrix revolutions: "tails" of basement-membrane components with angiostatic functions. *Trends Cell Biol* 2005;15(1):52-60..
225. Whitelock JM, Graham LD, Melrose J, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. Human perlecan immunopurified from different endothelial cell sources has different adhesive properties for vascular cells. *Matrix Biol* 1999;18(2):163-78.
226. Brown JC, Sasaki T, Gohring W, Yamada Y, Timpl R. The C-terminal domain V of perlecan promotes $\beta 1$ integrin-mediated cell adhesion, binds heparin, nidogen and fibulin-2 and can be modified by glycosaminoglycans. *Eur J Biochem* 1997;250(1):39-46.
227. Segev A, Nili N, Strauss BH. The role of perlecan in arterial injury and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2004;63(4):603-10.
228. Saku T, Furthmayr H. Characterization of the major heparan sulfate proteoglycan secreted by bovine aortic endothelial cells in culture. Homology to the large molecular weight molecule of basement membranes. *J Biol Chem* 1989;264(6):3514-23.
229. Iozzo RV, Hassell JR. Identification of the precursor protein for the heparan sulfate proteoglycan of human colon carcinoma cells and its post-translational modifications. *Arch Biochem Biophys* 1989;269(1):239-49.

230. Couchman JR, Kapoor R, Sthanam M, Wu RR. Perlecan and basement membrane-chondroitin sulfate proteoglycan (bamacan) are two basement membrane chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans in the Engelbreth-Holm-Swarm tumor matrix. *J Biol Chem* 1996;271(16):9595-602.
231. Iozzo RV. Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(8):646-56.
232. Raymond MA, Desormeaux A, Laplante P, Vigneault N, Filep JG, Landry K, et al. Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on VSMC. *Faseb J* 2004;18(6):705-7.
233. Raymond MA, Vigneault N, Luyckx V, Hebert MJ. Paracrine repercussions of preconditioning on angiogenesis and apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291(2):261-9.
234. Laplante P, Raymond MA, Gagnon G, Vigneault N, Sasseville AM, Langelier Y, et al. Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial apoptosis: implications in the pathophysiology of systemic sclerosis. *J Immunol* 2005;174(9):5740-9.
235. Raymond MA, Desormeaux A, Labelle A, Soulez M, Soulez G, Langelier Y, et al. Endothelial stress induces the release of vitamin D-binding protein, a novel growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338(3):1374-82.
236. Taylor KR, Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *Faseb J* 2006;20(1):9-22.
237. Gilbert ME, Kirker KR, Gray SD, Ward PD, Szakacs JG, Prestwich GD, et al. Chondroitin sulfate hydrogel and wound healing in rabbit maxillary sinus mucosa. *Laryngoscope* 2004;114(8):1406-9.
238. Campitiello E, Della Corte A, Fattopace A, D'Acunzi D, Canonico S. The use of artificial dermis in the treatment of chronic and acute wounds: regeneration of dermis and wound healing. *Acta Biomed Ateneo Parmense* 2005;76 Suppl 1:69-71.
239. Nishio M, Arai K. Quantitative Analysis of Chondroitin Sulfate in Tear Fluids following Laser in situ Keratomileusis. *Ophthalmic Res* 2006;38(5):274-9.

240. Homandberg GA, Guo D, Ray LM, Ding L. Mixtures of glucosamine and chondroitin sulfate reverse fibronectin fragment mediated damage to cartilage more effectively than either agent alone. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14(8):793-806.
241. Callow AD. Problems in the construction of a small diameter graft. *Int Angiol* 1988;7(3):246-53.
242. Merhi Y, King M, Guidoin R. Acute thrombogenicity of intact and injured natural blood conduits versus synthetic conduits: neutrophil, platelet, and fibrin(ogen) adsorption under various shear-rate conditions. *J Biomed Mater Res* 1997;34(4):477-85.
243. Benson, AE, Palmaz, JC, Tio, FO, Sprague, EA, Encarnacion, CE, Josephs, S. C. Polytetrafluoroethylene-encapsulated stent-grafts: use in experimental abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Interv Radiol* 10(5):605-612, 1999.
244. Cejna M, Virmani R, Jones R, Bergmeister H, Loewe C, Schoder M, et al. Biocompatibility and performance of the Wallstent and the Wallgraft, Jostent, and Hemobahn stent-grafts in a sheep model. *J Vasc Interv Radiol* 2002;13(8):823-30.
245. Wang C, Zhang Q, Uchida S, Kodama M. A new vascular prosthesis coated with polyamino-acid urethane copolymer (PAU) to enhance endothelialization. *J Biomed Mater Res* 2002;62(3):315-22.
246. Guidoin R, Douville Y, Basle MF, King M, Marinov GR, Traore A, et al. Biocompatibility studies of the anaconda stent-graft and observations of nitinol corrosion resistance. *J Endovasc Ther* 2004;11(4):385-403.
247. Falkenback D, Lundberg F, Ribbe E, Ljungh A. Exposure of plasma proteins on Dacron and ePTFE vascular graft material in a perfusion model. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;19(5):468-75.
248. Kidd KR, Nagle RB, Williams SK. Angiogenesis and neovascularization associated with extracellular matrix-modified porous implants. *J Biomed Mater Res* 2002;59(2):366-77.
249. Gerasimidis T, Sfyroeras G, Trellopoulos G, Skoura L, Papazoglou K, Konstantinidis K, et al. Impact of endograft material on the inflammatory response after elective endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *Angiology* 2005;56(6):743-53.

250. Soula P, d'Othee BJ, Ota P, Amin C, Khoury JE, Delisle MB, et al. Macroporous polyester-covered stent in an experimental abdominal aortic aneurysm model. *J Endovasc Ther* 2001;8(4):390-400.
251. D'Agostino R, Favia P, Oehr C, Wertheimer MR. Low-temperature plasma processing of materials: Past, present, and future. *Plasma Processes and Polymers* 2005;2(1):7-15.
252. Lerouge S, Fozza AC, Wertheimer MR, Marchand R, Yahia LH. Sterilization by low-pressure plasma: the role of vacuum-ultraviolet radiation. *Plasmas and Polymers* 2000;5(1):31-46.
253. P. LaRocca, S. Baker, *CellLine* 6 (1996) 1
254. Lerouge S, Guignot C, Tabrizian M, Ferrier D, Yagoubi N, Yahia LH. Plasma-based sterilization: Effect on surface and bulk properties and hydrolytic stability of reprocessed polyurethane electrophysiology catheters. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000;52(4):774-782..
255. Faucheux N, Schweiss R, Lutzow K, Werner C, Groth T. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials*. 2004 Jun;25(14):2721-30.
256. Bullett NA, Bullett DP, Truica-Marasescu FR, Lerouge S, Mwale F and Wertheimer MR. Polymer surface micropatterning by plasma and VUV-photochemical modification for controlled cell culture. *Journal Applied Surface Science*. 2004;235(4) : 395-405.
257. Girard-Lauriault P-L, Mwale F, Iordanova M, Demers C, Desjardins P, Wertheimer MR. Atmospheric pressure deposition of micropatterned nitrogen-rich plasma-polymer films for tissue engineering. *Plasma Processes and Polymers* 2005;2(3):263-270
258. Mwale F, Wang HT, Nelea V, Luo L, Antoniou J, Wertheimer MR. The effect of glow discharge plasma surface modification of polymers on the osteogenic differentiation of committed human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2006;27(10):2258-2264.
259. Nelea V, Luo L, Demers CN, Antoniou J, Petit A, Lerouge S, et al. Selective inhibition of type X collagen expression in human mesenchymal stem cell differentiation on polymer substrates surface-modified by glow discharge plasma. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 2005;75(1):216-223.

260. Favia P, Stendardo MV, d'Agostino R. Selective grafting of amine groups on polyethylene by means of $\text{NH}_3\text{-H}_2$ RF glow discharges. *Plasmas and Polymers* 1996;1(2):91-112.
261. D. H. Kaelble, "Physical Chemistry of Adhesion", J. Wiley & Sons, New York 1971.
262. Chuter TA. Stent-graft design: the good, the bad and the ugly. *Cardiovasc Surg* 2002;10(1):7-13.
263. Engellau L, Albrechtsson U, Norgren L, Larsson EM. Long-term results after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms with the Stentor and Vanguard stent-graft. *Acta Radiol* 2004;45(3):275-83.
264. Holtham SJ, Rose JD, Jackson RW, Lees TA, Wyatt MG. The Vanguard endovascular stent-graft: mid-term results from a single centre. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;27(3):311-8.
265. Cowie AG, Ashleigh RJ, England RE, McCollum CN. Endovascular aneurysm repair with the Talent stent-graft. *J Vasc Interv Radiol* 2003;14(8):1011-6.
266. Zarins CK. The AneuRx Clinical Trial at 8 years—Lessons learned following the Us AneuRx clinical trial from 1996 to 2004. *Supplement to Endovascular today* 2004(July):7-11.
267. Seriki DM, Ashleigh RJ, Butterfield JS, England A, McCollum CN, Akhtar N, et al. Midterm follow-up of a single-center experience of endovascular repair of abdominal aortic aneurysms with use of the talent stent-graft. *J Vasc Interv Radiol* 2006;17(6):973-7.
268. Torsello G, Osada N, Florek HJ, Horsch S, Kortmann H, Luska G, et al. Long-term outcome after Talent endograft implantation for aneurysms of the abdominal aorta: a multicenter retrospective study. *J Vasc Surg* 2006;43(2):277-84; discussion 284.
269. Chuter TA. The choice of stent-graft for endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2003;44(4):519-25.
270. Greenberg RK, Turc A, Haulon S, Srivastava SD, Sarac TP, O'Hara PJ, et al. Stent-graft migration: a reappraisal of analysis methods and proposed revised definition. *J Endovasc Ther* 2004;11(4):353-63.

271. Criado FJ, Clark NS, McKendrick C, Longway J, Domer GS. Update on the Talent LPS AAA stent graft: results with "enhanced talent". *Semin Vasc Surg* 2003;16(2):158-65.
272. Shabalovskaya SA. Surface, corrosion and biocompatibility aspects of Nitinol as an implant material. *Biomed Mater Eng* 2002;12(1):69-109.
273. Thierry B, Tabrizian M, Trepanier C, Savadogo O, Yahia L. Effect of surface treatment and sterilization processes on the corrosion behavior of NiTi shape memory alloy. *J Biomed Mater Res* 2000;51(4):685-93.
274. Badran MF, Gould DA, Raza I, McWilliams RG, Brown O, Harris PL, et al. Aneurysm neck diameter after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Interv Radiol* 2002;13(9 Pt 1):887-92.
275. Resch T, Ivancev K, Brunkwall J, Nirhov N, Malina M, Lindblad B. Midterm changes in aortic aneurysm morphology after endovascular repair. *J Endovasc Ther* 2000;7(4):279-85.
276. Luttkhuizen DT, Harmsen MC, Luyn MJ. Cellular and Molecular Dynamics in the Foreign Body Reaction. *Tissue Eng* 2006.
277. Yee C, Williams SK, Salzmann DL, Pond GD, Patula V, Berman SS, et al. Stent versus endovascular graft healing characteristics in the porcine iliac artery. *J Vasc Interv Radiol* 1998;9(4):609-17.
278. Marin ML, Veith FJ, Cynamon J, Sanchez LA, Bakal CW, Suggs WD, et al. Human transluminally placed endovascular stented grafts: preliminary histopathologic analysis of healing grafts in aortoiliac and femoral artery occlusive disease. *J Vasc Surg* 1995;21(4):595-603; discussion 603-4.
279. Hofman P. Molecular regulation of neutrophil apoptosis and potential targets for therapeutic strategy against the inflammatory process. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004;3(1):1-9.
280. Maras D, Lioupis C, Magoufis G, Tsamopoulos N, Moulakakis K, Andrikopoulos V. Covered Stent-Graft Treatment of Traumatic Internal Carotid Artery Pseudoaneurysms: A Review. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2006.

281. Onal B, Ilgit ET, Kosar S, Akkan K, Gumus T, Akpek S. Endovascular treatment of peripheral vascular lesions with stent-grafts. *Diagn Interv Radiol* 2005;11(3):170-4.
282. Casas J, Zhao Q, Donovan M, Schroeder P, Stokes K, Untereker D. In vitro modulation of macrophage phenotype and inhibition of polymer degradation by dexamethasone in a human macrophage/Fe/stress system. *J Biomed Mater Res* 1999;46(4):475-84.
283. Karamlou T, Williamson K, Kaufman J, Wiest J. Recognition of an infected endoluminal aortic prosthesis following repair of abdominal aortic aneurysm: case report and review of the literature. *Ann Vasc Surg* 2004;18(6):750-4.
284. Venne D, Raymond J, Allas S, Roy D, Leclerc G, Boushira M, et al. Healing of experimental aneurysms. II: Platelet extracts can increase the thickness of the neointima at the neck of treated aneurysms. *J Neuroradiol* 1999;26:92-100.
285. Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials* 2004;25(28):5947-54.
286. Lan MA, Gersbach CA, Michael KE, Keselowsky BG, Garcia AJ. Myoblast proliferation and differentiation on fibronectin-coated self assembled monolayers presenting different surface chemistries. *Biomaterials* 2005;26(22):4523-31.
287. Kasemo B, Gold J. Implant surfaces and interface processes. *Adv Dent Res* 1999;13:8-20.
288. Loo DT, Rillema JR. Measurement of cell death. *Methods Cell Biol* 1998;57:251-64.
289. Kenagy RD, Hart CE, Stetler-Stevenson WG, Clowes AW. Primate smooth muscle cell migration from aortic explants is mediated by endogenous platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor acting through matrix metalloproteinases 2 and 9. *Circulation* 1997;96(10):3555-60..
290. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 1995;21(5):1465-8.

291. Niemann-Jonsson A, Ares MP, Yan ZQ, Bu DX, Fredrikson GN, Branen L, et al. Increased rate of apoptosis in intimal arterial smooth muscle cells through endogenous activation of TNF receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(12):1909-14.
292. Nishio E, Arimura S, Watanabe Y. Oxidized LDL induces apoptosis in cultured smooth muscle cells: a possible role for 7-ketocholesterol. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;223(2):413-8.
293. Loberg RD, Vesely E, Brosius FC, 3rd. Enhanced glycogen synthase kinase-3beta activity mediates hypoxia-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells and is prevented by glucose transport and metabolism. *J Biol Chem* 2002;277(44):41667-73.
294. Harris PL, Buth J. An update on the important findings from the EUROSTAR EVAR registry. *Vascular* 2004;12(1):33-8.
295. Torella F. Effect of improved endograft design on outcome of endovascular aneurysm repair. *J Vasc Surg* 2004;40(2):216-21.
296. Al-Omran M, Verma S, Lindsay TF, Weisel RD, Sternbach Y. Clinical decision making for endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. *Circulation* 2004;110(23):e517-23.
297. Eton D, Terramani TT, Wang Y, Takahashi AM, Nigro JJ, Tang L, et al. Genetic engineering of stent grafts with a highly efficient pseudotyped retroviral vector. *J Vasc Surg* 1999;29(5):863-73.
298. Eton D, Yu H, Wang Y, Raines J, Striker G, Livingstone A. Endograft technology: a delivery vehicle for intravascular gene therapy. *J Vasc Surg* 2004;39(5):1066-73.

ANNEXES

Comité d'éthique de la recherche CHUM

APPRO  123



FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT (1)

Projet : TRAITEMENT ENDOVASCULAIRE DES ANÉVRISMES DE L'AORTE ABDOMINALE : ANALYSE DE STENT-GRAFTS EXPLANTÉS

Chercheurs principaux : Dr Sophie Lerouge, Ph.D. chercheure, Centre de recherche du CHUM et Dr Gilles Soulez, M.D., radiologue interventionniste, CHUM.

Collaborateurs : Dr Vincent Oliva, MD (radiologie, CHUM) ; Dr Louis Gaboury, MD (pathologie, CHUM) ; Dr Stephane Elkouri, Dr Jean-François Blair ; Dr Nathalie Beaudoin, Dr Luc Bruneau, Dr Yvan Douville (Québec-SFA), Dr Paul Petrsek (Calgary- Peter Lougheed Centre), Robert Guidoin, PhD, chercheur (CHUQ)

Organismes subventionnaires : Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ), Conseil National de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG).

INTRODUCTION

Vous êtes invité à participer à un projet de recherche sur le traitement endovasculaire des anévrismes de l'aorte abdominale afin d'aider la communauté scientifique et médicale à mieux comprendre les complications qui peuvent y survenir. Avant d'accepter de participer à ce projet, veuillez prendre le temps de lire et de comprendre les renseignements qui suivent. Le présent document peut contenir des termes que vous ne comprenez pas. Nous vous invitons à poser toutes les questions que vous jugez utiles au chercheur et à ses adjoints et à leur demander de vous expliquer les éléments qui ne sont pas clairs.

BUT DE L'ÉTUDE

Ce projet de recherche consiste à étudier des endoprothèses (ou stent-grafts) qui ont été implantées chez des patients souffrant d'un anévrisme de l'aorte abdominale, afin de mieux comprendre les phénomènes qui peuvent mener à l'échec ou aux complications de ce traitement, telles que les fuites sanguines, la migration, le bris de la prothèse ou un élargissement de l'anévrisme. Ces recherches sont menées par des chercheurs et médecins du CHUM. Durant ce projet de 5 ans, nous chercherons à analyser une vingtaine d'endoprothèses retirées lors d'une chirurgie ou d'une autopsie.

NATURE DE VOTRE PARTICIPATION

Lors de la chirurgie, qui a été décidée et planifiée par votre médecin, votre stent-graft sera retiré et remplacé par une prothèse vasculaire. Normalement, cet implant est jeté. Ce projet de recherche consiste simplement à étudier cet implant et les tissus qui lui sont attachés afin de comprendre les phénomènes impliqués dans l'échec de ce traitement.

Votre participation implique également votre accord pour que nous ayons accès à votre dossier médical et notamment aux images prises avant, pendant et après le traitement de votre anévrisme (radiographies, scanner etc...). En signant ce formulaire de consentement, vous autorisez également ce droit d'accès.

RISQUES ET INCONVÉNIENTS

Ce protocole de recherche ne comporte aucun risque supplémentaire pour vous, aucune implication de votre part, ni aucune modification de votre traitement.

AVANTAGES ET COMPENSATION

Vous ne retirerez aucun bénéfice personnel de votre participation à cette étude. Aucune compensation monétaire n'est prévue pour votre participation à l'étude. Toutefois les résultats obtenus contribueront à l'avancement des connaissances dans ce domaine.

CONFIDENTIALITÉ

Toutes les mesures appropriées seront prises afin que soit préservée la confidentialité des renseignements contenus dans votre dossier médical, s'il doit être consulté, et des données recueillies à votre sujet en cours d'étude. Seuls les chercheurs impliqués dans ce projet pourraient avoir accès aux informations confidentielles qui vous identifient par votre nom, au moment de l'étude du dossier clinique. En signant ce formulaire de consentement, vous autorisez ce droit d'accès.

L'accès à vos tissus prélevés dans le cadre de cette recherche et à votre dossier médical sera restreint aux seuls chercheurs de l'équipe de recherche. Un numéro sera attribué aux tissus explantés, ainsi qu'aux données cliniques, images et radiographies qui seront ainsi codifiées. La chercheuse principale de cette étude sera la seule à conserver la liste de correspondance entre le code et votre nom. Vous ne serez pas identifié par votre nom, dans quelque circonstance que ce soit. Votre anonymat sera assuré lors de la publication des résultats. Au bout des 5 ans, à la fin de ce projet de recherche, les tissus seront détruits. Les données et images qui seront conservées seront préalablement rendus anonymes.

COMMUNICATION DES RÉSULTATS

Les résultats spécifiques de notre étude sur l'anévrisme et la prothèse ne vous seront pas communiqués. Il en sera de même pour toute personne ou organisme qui pourrait se montrer intéressé à connaître ces résultats, sauf si la loi nous y oblige. Aucune information ne sera versée dans votre dossier médical.

FINANCEMENT DE LA RECHERCHE ET RETOMBÉES ÉCONOMIQUES

Les chercheurs ont obtenu une subvention de recherche d'un organisme gouvernemental canadien pour payer les dépenses encourues par les chercheurs et par l'hôpital pour réaliser le projet.

Les travaux de recherche pourraient permettre aux chercheurs et au CHUM de développer et/ou de commercialiser de nouveaux produits ou découvertes. Vous cédez cependant tout droit de propriété sur les tissus dont vous avez autorisé l'utilisation et sur les informations obtenues lors de leur utilisation. Vous ne bénéficierez donc d'aucune retombée financière liée à la commercialisation de ces découvertes ou produits, le cas échéant.

LIBERTÉ DE CONSENTEMENT ET DROIT DE RETRAIT

Votre participation est tout à fait volontaire et vous êtes totalement libre de participer ou non au présent projet de recherche. De plus, vous êtes libre, avant la chirurgie, de vous retirer du projet sans pénalité, sans que cela ne nuise à vos relations avec votre médecin et sans que la qualité des soins que vous recevez n'en soit affectée.

PERSONNES-RESSOURCES DU PROJET DE RECHERCHE

Personnes ressources responsables de la recherche

Si vous désirez de plus amples renseignements au sujet de votre participation, vous pouvez communiquer avec :

- Sophie Lerouge, Chercheure principale, Centre de Recherche du CHUM-Hôpital Notre-Dame. Tél : (514) 890-8000 p.28821
- Annie Major, Etudiante à la maîtrise, Centre de Recherche du CHUM-Hôpital Notre-Dame. Tél : (514) 890-8000 p.28723

Personnes ressources non liées à l'étude

Voici le numéro de téléphone de personnes qui ne sont pas liées à cette étude et à qui vous pouvez adresser vos plaintes relativement à cette étude ainsi que vos questions concernant vos droits en tant que participant à cette étude :

- **Hôpital Notre-Dame** : Louise Brunelle, Commissaire locale adjointe à la qualité des services : (514) 890-8000, poste 26047
- **Hôtel-Dieu** : Michèle Morin, Commissaire locale à la qualité des services : (514) 890-8000 poste 12761
- **Hôpital Saint-Luc** : M^{me} Christine Siclait, Commissaire locale adjointe à la qualité des services : (514) 890-8000 poste 36366



CONSENTEMENT

- Je déclare avoir lu le présent formulaire de consentement, particulièrement quant à la nature de ma participation au projet de recherche et l'étendue des risques qui en découlent. Je reconnais qu'on m'a expliqué le projet, qu'on a répondu à toutes mes questions et qu'on m'a laissé le temps voulu pour prendre une décision.
- Je consens librement et volontairement à participer à ce projet. On me remettra une copie signée du présent formulaire.
- En signant le présent formulaire, je ne renonce à aucun de mes droits légaux ni ne libère le chercheur, l'hôpital ou le commanditaire de leur responsabilité civile et professionnelle.

Nom du sujet

Signature du sujet

Date

Nom du témoin

Signature du témoin

Date

- Je certifie avoir expliqué au sujet la nature du projet de recherche ainsi que le contenu du présent formulaire, avoir répondu à toutes ses questions et avoir indiqué qu'il reste à tout moment libre de mettre un terme à sa participation. Je crois que le sujet comprend parfaitement mes explications et a donné un consentement éclairé. Je lui remettrai une copie signée du présent formulaire de consentement.

Nom du chercheur ou de la personne désignée par lui

Signature du chercheur ou de la personne désignée par lui

Date

3 exemplaires : Archives médicales, sujet, chercheur



FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT (2)

Projet : TRAITEMENT ENDOVASCULAIRE DES ANÉVRISMES DE L'AORTE ABDOMINALE : ANALYSE DE STENT-GRAFTS EXPLANTÉS

Chercheurs principaux : Dr Sophie Lerouge, Ph.D. chercheure, Centre de recherche du CHUM et Dr Gilles Soulez, M.D., radiologue interventionniste, CHUM.

Collaborateurs : Dr Vincent Oliva, MD (radiologie, CHUM) ; Dr Louis Gaboury, MD (pathologie, CHUM)

Organismes subventionnaires : Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ), Conseil National de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG).

PRÉAMBULE

Vous êtes atteint d'un anévrisme de l'aorte abdominale et, avec votre médecin, vous avez décidé d'être traité par la mise en place d'un stent-graft (ou endoprothèse). Cette procédure minimalement invasive est très prometteuse mais se heurte encore à certaines problématiques que notre équipe de recherche tente de résoudre. L'analyse de stent-grafts explantés lors d'autopsie est une source d'informations essentielles pour la communauté scientifique et médicale, afin de mieux comprendre les mécanismes de guérison après l'implantation de ces stent-grafts et d'améliorer éventuellement leur composition.

Avant d'accepter de participer à ce projet, veuillez prendre le temps de lire et de comprendre les renseignements qui suivent. Le présent document peut contenir des termes que vous ne comprenez pas. Nous vous invitons à poser toutes les questions que vous jugez utiles au chercheur et à ses adjoints et à leur demander de vous expliquer les éléments qui ne sont pas clairs.

BUT DE L'ÉTUDE

Ce projet de recherche consiste à étudier les endoprothèses (ou stent-grafts) qui ont été implantées chez des patients souffrant d'un anévrisme de l'aorte abdominale, afin de mieux comprendre les phénomènes qui peuvent mener à l'échec ou aux complications de ce traitement, telles que les fuites sanguines, la migration, le bris de la prothèse ou un élargissement de l'anévrisme. Ces recherches sont menées par des chercheurs et médecins du CHUM. Durant les 5 prochaines années, nous tenterons d'analyser une vingtaine d'endoprothèses retirées lors d'une chirurgie ou d'une autopsie.

NATURE DE VOTRE PARTICIPATION

L'autopsie est un procédé médical et scientifique effectué dans le but d'établir le plus précisément possible la cause d'un décès et de déterminer la nature et la cause des maladies ou autres états qui ont contribué au décès ou qui ont contribué à la présence d'autres maladies au moment du décès. L'autopsie, et les renseignements qui en découlent, contribuent au total des connaissances médicales.

APPROUVÉ Comité d'éthique de la recherche

CHUM ce 05 avril 2004

Votre collaboration à cette étude consiste à donner votre autorisation, pour qu'une autopsie soit pratiquée suite à votre décès, s'il devait survenir au cours des 5 prochaines années, qu'il soit relié ou non à votre pathologie d'anévrisme, et de consentir à ce que l'implant et l'anévrisme soient retirés et analysés par notre équipe.

Cette autopsie serait effectuée par les pathologistes du CHUM, qui prélèveraient le segment de l'aorte contenant l'anévrisme et le stent-graft et le mettraient à notre disposition pour analyse. Notre équipe de recherche tente en particulier de mieux comprendre les causes de complications et d'échec (s'il y a lieu) mais aussi les cas de bonne guérison des anévrismes.

Votre participation implique également votre accord pour que nous ayons accès à votre dossier médical et notamment aux images prises avant, pendant et après le traitement de votre anévrisme (radiographies, scanner etc...). En signant ce formulaire de consentement, vous autorisez également ce droit d'accès.

RISQUES ET INCONVÉNIENTS

Il n'y a aucun risque découlant de votre participation à ce projet de recherche, qui n'implique aucune implication de votre part, ni aucune modification de votre traitement.

Nous sommes très conscients des émotions additionnelles que la pratique d'une autopsie peut engendrer à la famille d'un défunt. Cependant, les résultats obtenus par le biais peuvent permettre une avancée importante des connaissances dans ce domaine.

AVANTAGES ET COMPENSATION

Ni vous ni votre famille ne retirerez aucun avantage personnel découlant de votre participation à cette étude. Aucune compensation monétaire n'est prévue pour votre participation à l'étude. Il est entendu qu'un rapport complet de l'autopsie sera envoyé à votre médecin traitant et que votre famille pourra obtenir les résultats de l'autopsie en s'adressant au service des archives du CHUM.

CONFIDENTIALITÉ

Toutes les mesures appropriées seront prises afin que soit préservée la confidentialité des renseignements contenus dans votre dossier médical, s'il doit être consulté en cours d'étude.

L'accès à vos tissus prélevés dans le cadre de cette recherche et à votre dossier médical sera restreint aux seuls chercheurs de l'équipe de recherche. Un numéro sera attribué à vos tissus, ainsi qu'aux données cliniques, images et radiographies qui seront ainsi codifiées. La chercheuse principale de cette étude sera la seule à conserver la liste de correspondance entre le code et votre nom. Vous ne serez pas identifié par votre nom, dans quelque circonstance que ce soit. Votre anonymat sera assuré lors de la publication des résultats.

Au bout des 5 ans, à la fin de ce projet de recherche, les tissus et implants seront détruits. Les données et images qui seront conservées seront préalablement rendus anonymes.

COMMUNICATION DES RÉSULTATS

Les résultats spécifiques de notre étude sur l'anévrisme et la prothèse ne seront pas communiqués à la famille. Il en sera de même pour toute personne ou organisme qui pourrait se montrer intéressé à connaître ces résultats, sauf si la loi nous y oblige. Enfin, à l'exception du

rapport d'autopsie proprement dit, aucune autre information ne sera versée dans votre dossier médical.

FINANCEMENT DE LA RECHERCHE ET RETOMBÉES ÉCONOMIQUES

Les chercheurs ont obtenu une subvention de recherche d'un organisme gouvernemental canadien pour payer les dépenses encourues par les chercheurs et par l'hôpital pour réaliser le projet.

Les travaux de recherche pourraient permettre aux chercheurs et au CHUM de développer et/ou de commercialiser de nouveaux produits ou découvertes. Vous cédez cependant tout droit de propriété sur les tissus dont vous avez autorisé l'utilisation et sur les informations obtenues lors de leur utilisation. Votre famille ne bénéficiera donc d'aucune retombée financière liée à la commercialisation de ces découvertes ou produits, le cas échéant.

LIBERTÉ DE CONSENTEMENT ET DROIT DE RETRAIT

Votre participation est tout à fait volontaire et vous êtes totalement libre de participer ou non au présent projet de recherche. De plus, vous êtes libre, avant votre décès, de vous retirer du projet sans pénalité, sans que cela ne nuise à vos relations avec votre médecin et sans que la qualité des soins que vous recevez n'en soit affectée.

PERSONNES-RESSOURCES

Personnes ressources responsables de la recherche

Si vous désirez de plus amples renseignements au sujet de votre participation, vous pouvez communiquer avec :

- Sophie Lerouge, Chercheure principale, Centre de Recherche du CHUM-Hôpital Notre-Dame.
Tél : (514) 890-8000 p.28821
- Annie Major, Etudiante à la maîtrise, Centre de Recherche du CHUM-Hôpital Notre-Dame.
Tél : (514) 890-8000 p.28723

Personnes ressources non liées à l'étude

Voici le numéro de téléphone de personnes qui ne sont pas liées à cette étude et à qui vous pouvez adresser vos plaintes relativement à cette étude ainsi que vos questions sur la recherche et vos droits en tant que participant à cette étude :

- **Hôpital Notre-Dame** : Louise Brunelle, Commissaire locale adjointe à la qualité des services : (514) 890-8000, poste 26047
- **Hôtel-Dieu** : Michèle Morin, Commissaire locale à la qualité des services : (514) 890-8000 poste 12761
- **Hôpital Saint-Luc** : M^{me} Christine Siclait, Commissaire locale adjointe à la qualité des services : (514) 890-8000 poste 36366



CONSENTEMENT

- Je déclare avoir lu et compris le présent formulaire d'information et de consentement, particulièrement quant à la nature de ma participation au projet de recherche. Je reconnais qu'on m'a expliqué le projet, qu'on a répondu à toutes mes questions et qu'on m'a laissé le temps voulu pour prendre une décision
- J'autorise par la présente les pathologistes et autres médecins du CHUM et à leur personnel d'effectuer un examen post-mortem complet (autopsie) sur ma personne, suite à mon décès. On me remettra une copie signée du présent formulaire.
- En signant le présent formulaire, je ne renonce à aucun de mes droits légaux ni ne libère le chercheur, l'hôpital ou le commanditaire de leur responsabilité civile et professionnelle.

Nom du sujet

Signature du sujet

Date

Nom du témoin

Signature du témoin

Date

- Je certifie avoir expliqué au sujet la nature du projet de recherche ainsi que le contenu du présent formulaire, avoir répondu à toutes ses questions et avoir indiqué qu'il reste à tout moment libre de mettre un terme à sa participation. Je crois que le sujet comprend parfaitement mes explications et a donné un consentement éclairé. Je lui remettrai une copie signée du présent formulaire de consentement.

Nom du chercheur ou de la personne désignée par lui

Signature du chercheur ou de la personne désignée par lui

Date

3 exemplaires : Archives médicales, sujet, chercheur

Annexe 3- PROTOCOLE POUR L'ADHÉSION

1) Préparer une plaque de 24 puits avec la membrane à tester.

-Faire les contrôles positifs et négatifs à chaque fois.

-Si plus qu'une plaque dans une expérience, mélanger, les plaques moitié/moitié.

(ex : 1 plaque PET et 1 plaque PET mod = 2 plaques moitié PET moitié PET mod)

1.1) Découper les membranes sous la hotte biologique avec du matériel stérile (scalpel, planche en verre, lamelle de plastique, pince en métal fine) et mettre dans le fond des puits de la plaque.

1.2) Faire 6 échantillons par condition.

1.3) Mettre 1 cloning cylinder stérile (10 mm extérieur) dans chaque puit, centré sur chaque membrane.

2) Préparer les cellules

2.1) Lavage avec 6-7 ml de PBS1X et ensuite 2 ml de trypsine par flasque de 75ml.

2.2) Laisser incuber pendant 2 à 5 minutes.

2.3) Rajouter de 2 ml de milieu Normal dans chaque flasque.

2.4) Récupérer les cellules et les mettre dans un tube de 15 ou 50 ml.

2.5) Compter les cellules.

2.6) Faire la dilution nécessaire pour obtenir la concentration cellulaire voulue.

normalement 50 000 cellules dans 200 µl

2.7) Si le test d'adhésion ne s'effectue pas en milieu normal, mettre le nombre de cellules requis dans un tube de 15 ml.

(ex : 300 000 cellules dans 6 puits (4.8ml), mais en prévoir un peu plus comme 312500 cellules dans 5 ml)

2.8) Centrifuger pendant 10 minutes à 1400 rpm (programme 2 de la centrifugeuse)

2.9) Resuspendre dans le milieu nécessaire.

3) Mettre les cellules dans les cloning cylinder (50 000 cellules dans 200µl)

Les cloning cylinder ne prennent pas plus de 200µl

---si un puit est vide, ajouter 500µl de PBS---

4) Laisser adhérer 1 ou 4 heures dans l'incubateur à 37°C avec 5% de CO₂

5) Sortir les cellules :

-sous la hotte biologique :

5.1) Laver les membranes 2 fois avec du PBS 1X. (dans des plaques de 24 puits différentes)

5.2) Mettre dans une nouvelle plaque avec 500 µl de PBS 1X dans chaque puit.

- en dehors de la hotte biologique (comptoir du labo)

5.3) Mettre 1/10 de volume de **cristal violet (0, 75%)** dans chaque puit (50µl).

5.4) Laisser colorer pendant 15 minutes.

5.5) Rincer 3 fois avec de l'eau (dans des plaques de 24 puits différentes).

5.6) Mettre dans une nouvelle plaque de 24 puits et laisser sécher 24 heures.

6) Prendre les photos

6.1) Installer la caméra sur la microscopique optique (pas inversé).

6.2) Ajuster le zoom pour ne plus voir le contour noir. (3.1)

6.3) Mettre chaque membrane entre lame et lamelle.

6.4) Mettre le microscope au grossissement 40X.

6.5) Prendre 3 photos représentatives de toute la surface (même endroit sur toutes les membranes dans la mesure du possible).

7) Voir et sélection morphologie cellulaire intéressante et faire des photos à fort grossissement.**8) Compiler les résultats.**

Annexe 4- PROTOCOLE POUR LA MIGRATION

1) Préparer une plaque de 24 puits avec la membrane à tester.

1.1) Découper les membranes sous la hotte biologique avec du matériel stérile (scalpel, planche en verre, lamelle de plastique, pince en métal fine) et mettre dans le fond des puits de la plaque.

1.2) Mettre 1 aiguille stérile dans le milieu de chaque puit (23G BD).

*****elle doit être solide et ne plus bouger*****

2) Préparer les cellules

2.1) Lavage avec 6-7 ml de PBS 1X et ensuite 2 ml de trypsine par flasque de 75 ml.

2.2) Laisser incuber pendant 2 à 5 minutes.

2.3) Rajouter de ml de milieu Normal dans chaque flasque.

2.4) Récupérer les cellules et les mettre dans un tube de 50 ml.

2.5) Compter les cellules.

2.6) Faire la dilution nécessaire pour obtenir la concentration cellulaire voulue.

3) Mettre les cellules moitié-moitié de chaque côté de l'aiguille.

4) Laisser proliférer dans l'incubateur à 37°C avec 5% de CO₂.

5) Changer le milieu tous les 2 jours (en conservant l'aiguille).

6) Lorsque les cellules sont à 80% de confluence, mettre les différentes conditions à tester et enlever l'aiguille. Il faut arrêter au moins 3 puits qui serviront comme contrôle négatif.

Pour les VSM :

- Milieu SS +/- facteur : 16 heures de migration.

- Milieu N +/- facteur : 12 heures de migration.

Pour les fibroblastes: (à vérifier)

- Milieu SS +/- facteur : 24 heures de migration.

- Milieu N +/- facteur : 16 heures de migration.

7) Sortir les cellules :**-Sous la hotte biologique :**

7.1) Laver 2 fois avec du PBS 1X (dans des plaques de 24 puits différentes).

7.2) Mettre dans une nouvelle plaque avec 500 µl de PBS 1X dans chaque puit.

- En dehors de la hotte biologique (comptoir du labo)

7.3) Mettre 1/10 de volume de cristal violet (0, 75%) dans chaque puit (50µl).

7.4) Laisser colorer pendant 15 minutes.

7.5) Rincer 3 fois avec de l'eau (dans des plaques de 24 puits différentes).

7.6) Mettre dans une nouvelle plaque de 24 puits et laisser sécher 24 heures.

8) Prendre les photos.

8.1) Installer la caméra sur la microscopique optique (pas inversé).

8.2) Ajuster le zoom au maximum (**10X grossissement**).

8.3) mettre chaque membrane entre lame et lamelle.

8.4) prendre 3 photos représentatives de toute la surface de migration (même endroit sur toutes les membranes dans la mesure du possible).

9) Compter les cellules.

9.1) Utiliser PowerPoint.

9.2) Tracer 2 lignes sur la ligne de migration pour le milieu de référence.

9.3) Transférer ces 2 lignes sur toutes les autres photos.

9.4) Compter les cellules entre les 2 lignes ce qui correspond aux cellules qui ont migrées.

9.5) Compiler les résultats.

Annexe 5- PROTOCOLE POUR L'APOPTOSE

*****Avoir une seule plaque à la fois*** (maximum 2 mais pas préférable)**

1) Préparer une plaque de 24 puits avec la membrane à tester

1.1) Découper les membranes sous la hotte biologique avec du matériel stérile (scalpel, planche en verre, lamelle de plastique, pince en métal fine) et mettre dans le fond des puits de la plaque.

1.2) Faire 6 échantillons par condition.

2) Préparer les cellules

2.1) Lavage avec 6-7 ml de PBS 1X et ensuite 2ml de trypsine par flasque de 75ml.

2.2) Laisser incuber pendant 2 à 5 minutes.

2.3) Rajouter de ml de milieu Normal dans chaque flasque.

2.4) Récupérer les cellules et les mettre dans un tube de 50 ml.

2.5) Compter les cellules.

2.6) Faire la dilution nécessaire pour obtenir la concentration cellulaire voulue.

3) Mettre les cellules sur les membranes avec une goutte de 100 μ l (sauf sur le PS mettre les cellules dans 500 μ l)

*****La goutte ne doit pas se briser*****

4) Laisser adhérer 4 hrs dans l'incubateur à 37°C avec 5% de CO₂

5) Rincer une fois avec du PBS 1X et laisser proliférer un minimum de 2 jours en milieu normal.

6) Changer le milieu tous les 2 jours.

7) Lorsque les cellules sont confluentes, mettre les différentes conditions à tester :

- 8 heures pour les VSM

- 7 jours pour les fibroblastes

8) Coloration au HOPI (voir protocole du labo)

- 8.1) Fermer la lumière de la hotte
- 8.2) Décongeler sur glace la solution déjà diluée de Hoeschst environ 10 minutes avant.
- 8.3) Ajouter directement dans chaque puits 5µl de Hoeschst.
- 8.4) Laisser incuber 10 minutes à 37°C avec 5% CO₂.
- 8.5) Pendant l'incubation :
 - Allumer le bloc de fluorescence (**microscope inversé**).
 - Installer la caméra (formatage et remis du compteur à zéro).
 - Fine pour les VSM et Normal pour les fibroblastes avec le bouton QUAL.
 - Grossissement : VSM 20X, Fibroblaste 20X.

9) Préparer la solution de PI.

- 9.1) Faire dilution de PI dans du PBS 1X (1/200)
 - plaque de 24 puits : 70µl de PI dans 14 ml PBS 1X pour VSM.
 - plaque de 24 puits : 55µl de PI dans 14 ml PBS 1X pour Fibroblaste.

10) Coloration par le PI

- 10.1) Sortir la plaque de l'incubateur.
- 10.2) Aspirer le milieu de culture.
- 10.3) Lavage 1x avec PBS 1X (attention de ne pas décoller les cellules).
- 10.4) Ajouter 500µl par puit de la solution de PI diluée.

11) Prendre les photos.

- 11.1) Pour les VSM, ajuster le Zoom pour avoir environ 100 cellules.
Pour les fibroblastes ajuster F= 5.0

NE PLUS MODIFIER LES RÉGLAGES

- 11.2) Faire la mise au point avec le microscope à la première photo dans chaque puit.
- 11.3) prendre 3 photos représentatives de toute la surface (même endroit sur toutes les membranes dans la mesure du possible).

12) Compiler les résultats (cellules en apoptose, en nécrose et/ou saines).

Annexe 6- PROTOCOLE POUR LA CROISSANCE CELLULAIRE

Avoir une seule plaque pour chaque time point

1) Préparer une plaque de 24 puits avec la membrane à tester

- 1.1) Découper les membranes sous la hotte biologique avec du matériel stérile (scalpel, planche en verre, lamelle de plastique, pince en métal fine) et mettre dans le fond des puits de la plaque.
- 1.2) Mettre 1 cloning cylinder dans chaque puit, centré sur chaque membrane.
- 1.3) Faire 1 plaque pour chaque temps de prolifération.

2) Préparer les cellules.

- 2.1) Lavage avec 6-7 ml de PBS 1X et ensuite 2ml de trypsine par flasque de 75ml.
- 2.2) Laisser incuber pendant 2 à 5 minutes.
- 2.3) Rajouter de ml de milieu Normal dans chaque flasque.
- 2.4) Récupérer les cellules et les mettre dans un tube de 50 ml.
- 2.5) Compter les cellules.
- 2.6) Faire la dilution nécessaire pour obtenir la concentration cellulaire voulue.
Mettre le double de cellules sur le PET

3) Mettre les cellules dans les cloning cylinder (--- cellules dans 200µl).

Les cloning cylinder ne prennent pas plus de 200µl

4) Laisser adhérer 4 hrs et laver PBS 1X 1 fois.

5) Changer le milieu tous les 2 jours (en conservant les cloning cylinder).

Pour la cinétique : Sortir les cellules aux différents temps:

6) Lorsque les cellules sont à 50% de confluence, mettre les différentes conditions à tester pour 96 hrs (4 jours).

7) Coloration au HOPI (voir protocole du labo)

- 7.1) Fermer la lumière de la hotte
- 7.2) Décongeler sur glace la solution déjà diluée de Hoeschst environ 10 minutes avant.
- 7.3) Ajouter directement dans chaque puits 5µl de Hoeschst.
- 7.4) Laisser incuber 10 minutes à 37°C avec 5% CO₂.
- 7.5) Pendant l'incubation :
 - Allumer le bloc de fluorescence (**microscope inversé**).
 - Installer la caméra (formatage et remis du compteur à zéro).
 - Fine pour les VSM et Normal pour les fibroblastes avec le bouton QUAL.
 - Grossissement : VSM 20X, Fibroblaste 20X.

8) Préparer la solution de PI.

- 8.1) Faire dilution de PI dans du PBS 1X (1/200)
 - plaque de 24 puits : 70µl de PI dans 14 ml PBS 1X pour VSM.
 - plaque de 24 puits : 55µl de PI dans 14 ml PBS 1X pour Fibroblaste.

9) Coloration par le PI

- 9.1) Sortir la plaque de l'incubateur.
- 9.2) Aspirer le milieu de culture.
- 9.3) Lavage 1x avec PBS 1X (attention de ne pas décoller les cellules).
- 9.4) Ajouter 500µl par puit de la solution de PI diluée.

10) Prendre les photos.

- 10.1) Pour les VSM, ajuster le Zoom pour avoir environ 100 cellules.
Pour les fibroblastes ajuster F= 5.0

NE PLUS MODIFIER LES RÉGLAGES

- 10.2) Faire la mise au point avec le microscope à la première photo dans chaque puit.
- 10.3) prendre 3 photos représentatives de toute la surface (même endroit sur toutes les membranes dans la mesure du possible).

11) Compiler les résultats (cellules en apoptose, en nécrose et/ou saines).

Annexe 7- PROTOCOLE POUR LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE

1) Préparer une plaque de 6 puits avec la membrane à tester

1.1) Découper les membranes sous la hotte biologique avec du matériel stérile (scalpel, planche en verre, lamelle de plastique, pince en métal fine) et mettre dans le fond des puits de la plaque.

1.2) Mettre 1 lame dans une partie du puit pour maintenir la membrane dans le fond.

2) Préparer les cellules.

2.1) Lavage avec 6-7 ml de PBS 1X et ensuite 2ml de trypsine par flasque de 75ml.

2.2) Laisser incuber pendant 2 à 5 minutes.

2.3) Rajouter de ml de milieu Normal dans chaque flasque.

2.4) Récupérer les cellules et les mettre dans un tube de 50 ml.

2.5) Compter les cellules.

2.6) Faire la dilution nécessaire pour obtenir la concentration cellulaire voulue ($\frac{1}{2}$ ou $\frac{1}{4}$ de flasque)

3) Mettre les cellules des 2 côtés de la lame.

4) Laisser proliférer dans l'incubateur à 37°C avec 5% de CO₂ , jusqu'à confluence.

5) Changer le milieu tous les 2 jours.

6) Lorsque les cellules sont confluentes, mettre les différentes conditions pour 7 jours

Pour obtenir la confluence, on peut aussi mettre le nombre de cellules requis pour la confluence

7) Changer le milieu tous les 2 jours (2^e , 4^e, 7^e journée).

8) Voir protocole du labo de Marie-Josée Hébert et prévoir 3 jours complet de travail.

WESTERN BLOT

(Protocole laboratoire du Dre. Marie-Josée Hébert)

1. EXTRACTION DES PROTÉINES

Préparation du tampon d'extraction :

RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer)

4,38g NaCl

0,186g EDTA (disodium salt)

0,605g Tris (10mM)

5,0g Sodium deoxycholate ajuster le pH à 8,0

5ml Igepal

qsp 500ml eau

Inhibiteurs

0,01mg/mL Aprotinine (10mg/mL), --- à 4°C, tiroir B11

0,01mg/mL Leupeptine (10mg/mL) --- à -20°C, tiroir A11

1mM Sodium orthovanadate (1M) (NaVO₃) --- à 4°C, tiroir B11

0,002mg/mL NaF (0,5M, 210mg/10mL) --- tiroir---

0,1% PMSF (200mM) ---tablette bouchon vert---

Quantité de chaque élément pour préparer le tampon d'extraction

	1mL	2,5mL	5mL	10mL
Aprotinine	10µL	25µL	50µL	100µL
Leupeptine	10µL	25µL	50µL	100µL
NaVO ₃	10µL	25µL	50µL	100µL
NaF	100µL	250µL	500µL	1mL
PMSF	5µL	12,5µL	25µL	50µL
RIPA	912µL	2,28mL	4,55mL	8,65mL

1. Récupérer les cellules dont on doit extraire les protéines :
 - Si les cellules sont adhérentes : les trypsiniser
 - Si les cellules sont en suspension : numérer les cellules
 2. Centrifuger la suspension cellulaire 10 minutes, à 4°C, à 1400rpm.
 3. Laver au PBS 1X (effectuer un numération des cellules à cette étape pour les cellules adhérentes si nécessaire) et centrifuger la suspension cellulaire 10 minutes, à 4°C, à 1400rpm.
 4. Aspirer le surnageant et congeler le culot cellulaire à -80°C.
 5. Décongeler le culot cellulaire sur glace.
- }

Pas besoin de faire l'étape 4 et 5 si on fait l'extraction tout de suite
6. Ajouter le tampon d'extraction (RIPA+inhibiteurs) sur le culot cellulaire décongelé (Mettre environ 125µL de tampon d'extraction pour une flasque de 75cm², 50µL pour une flasque de 25cm²). Resuspendre le culot.
 7. Soniquer 30 secondes (pulsed, 60-70) sur glace.(Rincer avec de l'eau entre chaque échantillon)
 8. Incuber 1 heure sur glace.
 9. Centrifuger 30 minutes, à 4°C, à 1400rpm.
 10. Récupérer le surnageant.
 11. Effectuer le dosage des protéines de l'échantillon (cf. 2) et aliquoter si possible l'échantillon.
 12. Conserver l'extrait protéique à -20°C, correctement identifié (nom de l'échantillon, condition, date d'extraction...).

2. DOSAGE DES PROTÉINES

Effectuer le dosage des protéines à l'aide du kit :

« BCA Protein Assay Kit » (BCA : bicinchoninic acid).

➤ Préparation du Working Reagent (WR)

Prévoir 2mL de WR par tube. Effectuer la solution de WR en mélangeant 50 du « BCA Reagent A » pour 1 du « BCA Reagent B » (turquoise).

A	B
40mL	0,8mL
50mL	1mL
60mL	1,2mL
70mL	1,4mL
80mL	1,6mL
90mL	1,8mL
100mL	2mL

A	B
40mL	0,8mL
50mL	1mL
60mL	1,2mL
70mL	1,4mL
80mL	1,6mL
90mL	1,8mL
100mL	2mL

A	B
40mL	0,8mL
50mL	1mL
60mL	1,2mL
70mL	1,4mL
80mL	1,6mL
90mL	1,8mL
100mL	2mL

IMPORTANT! : L'ajout du WR doit se faire en **DERNIER**. Préparer tous les tubes (100µL de liquide par tube), et ajouter les 2mL de WR au repeater.

➤ **Préparation des tubes standards pour la gamme**

Préparer 2 tubes par dilution d'albumine.

Dans chaque tube, ajouter 100µL des dilutions d'albumine déjà réalisées (conservées à 4°C, de 2µg/100µL à 100µg/100µL) et 2mL de WR.

➤ **Préparation des tubes « blancs »**

Préparer 2 tubes « blancs » en ajoutant 100µL d'eau distillée dans chaque tube et 2mL de WR par tube.

➤ **Préparation des échantillons à doser**

Préparer 2 tubes par échantillon à doser.

Dans chaque tube, ajouter une dilution au 1/20 de l'échantillon (5µL + 95µL d'eau distillée pour chaque tube) et ajouter 2mL de WR par tube.

Préparer également 2 tubes avec du tampon d'extraction en diluant le tampon d'extraction au 1/20 (5µL + 95µL d'eau distillée pour chaque tube) et ajouter 2mL de WR par tube.

Note : si la concentration en protéines des échantillons est trop faible, changer le facteur de dilution pour les tubes « blancs » et les tubes des échantillons.

➤ **Recouvrir les tubes d'un saran wrap et incuber 30 minutes à 37°C.**

➤ **Lecture au spectrophotomètre**

- Allumer l'ordinateur. Dans le programme de lecture (DU 800 spectrophotometer), en haut à gauche, vérifier que « protein assay analysis » est sélectionné et choisir un profil (profil Normand toutes les dilutions d'albumine sont incluses). Allumer la lampe (appuyer à l'écran sur « visible »). La lecture se fait à 562nm.

- Vérifier tous les paramètres de lecture (à gauche)

Method parameters	Value
Sampling device	sipper
Assay type	BCA
Analytical wavelenght	562,0 nm
Curve Fit Mode	Linear, Zero Int
Number of standards	10
Standard replicates	2
Units	µg/100µL
Sample replicates	2
Read average time	0,50 s

Si ces paramètres ne sont pas exacts, les modifier dans le menu « Methods », « Edit/Create ».

- Nettoyer le spectrophotomètre : passer de l'eau distillée (bouton « flush ») puis de l'alcool (flush) et repasser de l'eau distillée (flush).
- Appuyer sur le bouton « return » pour vider la cellule.
- Passer un tube « blanc » (l'écran indique « fill blank »), puis passer le 2^{ème} tube « blanc » pour vérifier le 0. Presser « return » (x2).
- **Passer les tubes de la gamme standard** : commencer par la concentration la plus faible et passer les tubes en double (bouton « fill read »). Presser « return » entre les 2 tubes de même concentration et presser 2 fois « return » entre les tubes de concentrations différentes.
- Une fois que tous les tubes de la gamme sont lus, la courbe d'étalonnage apparaît. Imprimer les données et la courbe.
- **Passer les tubes des échantillons** : indiquer le nom de l'échantillon et le facteur de dilution (20) et passer les tubes en double (bouton « fill read »). Presser « return » entre les 2 tubes du même échantillon et presser 2 fois « return » entre les tubes

d'échantillons différents. Passer les 2 tubes avec le tampon d'extraction avec les tubes d'échantillons.

- Une fois que tous les tubes des échantillons sont passés, imprimer les données.
- Nettoyer le spectrophotomètre : passer de l'eau distillée (bouton « flush ») puis de l'alcool (flush) et repasser de l'eau distillée (flush).
- Fermer le programme (ainsi que la lampe).
- Éteindre l'ordinateur.

3. MIGRATION

➤ Préparation des échantillons

Il faut au moins 50µg de protéines par puit (mieux si 100µg). Compter un volume total de 50µL par puit pour un peigne de 10 puits.

En fonction du dosage effectué, ajuster la quantité d'échantillons nécessaires avec de l'eau (volume eau + protéines = 40µL). Il faut ajouter du tampon 5X (bleu) pour chaque échantillon (ajouter 10µL de tampon pour un volume total de 50µL)

Préparer le poids moléculaire : 7µL de ladder + 33µL d'eau + 10µL de tampon 5X

Préparer un contrôle avec du tampon d'extraction de la même façon que pour les échantillons (40µL de tampon d'extraction + 10µL de tampon 5X).

Si plusieurs puits sont vides, les remplir avec du contrôle ou de l'eau (40µL d'eau + 10µL de tampon 5X)..

Faire bouillir les échantillons, le poids moléculaire et le(s) contrôle(s) pendant 5-10 minutes et effectuer un quickspin.

➤ Migration

- Effectuer le montage : voir fiche bio-rad Mini PROTEAN 3 Cell Assembly guide – Gel cassette preparation.
 - Faire une marque sur les vitres à 5,5 cm
 - Identifier les gels sur les vitres
- Tester si le montage est étanche en y mettant de l'eau pendant 10 minutes et s'assurer que le montage ne coule pas.

- **Préparer le gel de séparation**

Pour 2 gels (petits, volume : 15,6mL) :

	Gel à 10%	Gel à 12%	Gel à 15%
Acrylamide-bisacrylamide	5mL	6mL	7,5mL
8x Tris-HCl pH8,8	3,75mL	3,75mL	3,75mL
H ₂ O	6,25mL	5,25mL	3,75mL
APS*	50μL	50μL	50μL
TEMED	10μL	10μL	10μL

*APS (ammonium persulfate) : 0,1g d'APS dans 1mL d'eau fraîchement préparée.

Le couler dans le montage à l'aide d'une seringue jusqu'à environ 5,5cm et ajouter du butanol saturé d'eau afin que le haut du gel soit parfaitement plat. Laisser polymériser 1 heure (ou laisser polymériser toute la nuit).

- **Préparer le gel de concentration**

à 1,5% d'acrylamide (stacking gel, pour 2 mini gels 1,5mm ou 1 grand gel, vol : 11,02mL)

Acrylamide-bisacrylamide	1,3mL
8x Tris-HCl pH6,8	2,5mL
H ₂ O	7,1mL
APS*	99μL
TEMED	20μL

Rincer le butanol sturé d'eau et couler le gel de concentration par-dessus le gel de séparation à l'aide d'une seringue. Ajouter le peigne. Laisser polymériser 20 à 30 minutes pendant lesquelles on peut préparer les échantillons.

- Remplir la cuve de moitié avec du tampon de migration 1X (dilution dans de l'eau distillée) « used ».
- Ajouter le montage avec les gels (Attention de bien caler les plaques de verre pour assurer une bonne étanchéité).
- Remplir l'espace entre les 2 gels avec du tampon de migration 1X non utilisé.
- Déposer les échantillons et le poids moléculaire dans les puits à l'aide d'un tip allongé.
- Effectuer le branchement avec le générateur (vérifier la polarité).

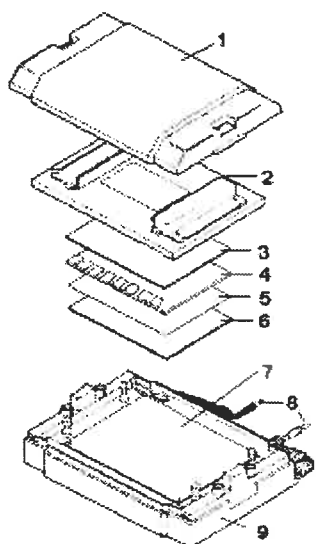
Réglages du générateur : **40mA par gel** (soit 0,08A pour 2 gels), puissance au maximum, voltage au maximum.

- Faire migrer à température ambiante jusqu'à ce que le front migration arrive en bas du gel (environ 2h de migration).
- Démonter les plaques. Enlever le gel de concentration et faire tremper le gel de séparation dans du tampon de transfert (qui est au frigo) pendant environ 30 à 60 minutes à 4°C afin de l'équilibrer.

4. TRANSFERT

Avec système de transfert semi-dry de Biorad

- **ATTENTION : Ne jamais toucher la membrane de nitrocellulose avec les doigts!!!!**
- Dans un plat rempli de tampon de transfert 1X, effectuer le montage suivant :
 - Déposer 1 papier filtre épais
 - Déposer le gel
 - Déposer la membrane de nitrocellulose sur le gel (couper la membrane dans le coin droit en bas)
 - Déposer 1 papier filtre épais
- Laisser tremper dans le tampon de transfert 1X pendant 15 minutes
- Faire le montage suivant



- 1 Couvercle sécuritaire de l'appareil
- 2 Couvercle contenant la cathode
- 3 Papier filtre épais
- 4 Gel
- 5 Membrane de nitrocellulose
- 6 Papier filtre épais
- 7 plateforme de l'appareil
- 8 fil d'alimentation
- 9 Base de l'appareil

- Passer un rouleau sur le papier filtre pour enlever les bulles d'air avant de fermer l'appareil avec le couvercle

Réglages du générateur : **15V** pour 2 gels pendant 1 heure

5. BLOCAGE DE LA MEMBRANE ET ADDITION DES ANTICORPS

Note : Compter environ 20mL de liquide pour un contenant de membrane pour effectuer toutes les étapes suivantes.

- Effectuer un rouge Ponso (au frigo) avant de bloquer la membrane. Incuber 10 minutes environ. Rincer la membrane à l'eau distillée pour éliminer l'excès de rouge Ponso. Insérer la membrane dans un film plastique et effectuer un scan.
- Laver la membrane à l'eau distillée et avec du TBS.
- Bloquer la membrane avec du lait 5%. Incuber 1 heure environ.
- Préparer la dilution de l'anticorps primaire. Compter 5mL de la dilution par membrane.
- Insérer la membrane dans un sachet plastique scellé et avant de fermer, ajouter la dilution d'anticorps primaire. S'assurer qu'il n'y a pas de bulle et sceller le dernier côté du sachet. Placer le sachet à 4°C, sous agitation, toute la nuit.
- Effectuer 3 lavages de 5 minutes au TTBS 0,05% (TBS Tween) puis 1 lavage d'une heure au TTBS 0,05%.
- Préparer la dilution d'anticorps secondaire. Incuber la membrane avec la dilution d'anticorps secondaire pendant 1 heure.
- Effectuer 3 lavages de 5 minutes au TTBS 0,05% (TBS Tween) puis 1 lavage d'une heure au TTBS 0,05%.

6. RÉVÉLATION

- Préparer la solution ECL.
 - Aller dans la chambre noire.
 - Faire tremper la membrane dans la solution d'ECL 30 à 40 secondes.
 - Eponger avec du papier Whatman le surplus de solution.
 - Mettre la membrane dans un film de plastique dans une cassette et ajouter un film.
- ATTENTION : les films ne doivent pas être exposés à la lumière blanche : manipuler les films sous lumière rouge.
- Exposer le film plus ou moins longtemps et introduire le film la développeuse.

7. STRIPPING

Solution de stripping

2 % SDS

100 mM β -mercaptoethanol

62,5 mM Tris-HCl pour ajuster le pH à 6,7

- Incuber les membranes dans la solution de stripping pour 20 minutes à 50°C sous agitation.
- Effectuer 3 lavages de 5 minutes dans l'eau.
- Effectuer 3 lavages de 5 minutes avec du TBS.
- Rebloquer la membrane avec du lait 1% et refaire les étapes à partir de ce point pour un autre anticorps primaire.

Annexe 8- ACCORD DES COAUTEURS ET PERMISSION DE L'ÉDITEUR (Article I)

Implant Degradation and Poor Healing After Endovascular Repair of Abdominal Aortic Aneurysms: An Analysis of Explanted Stent-Grafts

A) Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Annie Major,

GBM, Génie Biomédical

2. Description de l'article

Publié dans le : Journal of Endovascular Therapy (JEVT) en août 2006

(J Endovasc Ther 13;457-467, 2006)

Implant Degradation and Poor Healing After Endovascular Repair of Abdominal Aortic Aneurysms: An Analysis of Explanted Stent-Grafts

Annie Major¹, Robert Guidoin², Ph.D., Gilles Soulez¹, M.D., Louis A. Gaboury¹, M.D., Guy Cloutier¹, Ph.D., Marc Sapoval³, M.D., Yvan Douville², M.D., Guy Dionne², M.D., Robert H. Geelkerken⁴, M.D., Paul Petrusek⁵, M.D., and Sophie Lerouge¹, Ph.D.

¹ Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montreal, Qc, Canada

² Department of Surgery, Université Laval, Quebec, Qc, Canada

³ Service de Radiologie Cardiovasculaire, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

⁴ Department of Vascular Surgery, Medische Spectrum Twente, Enschede, The Netherlands

⁵ Division of Vascular Surgery, Peter Lougheed Centre, Calgary, Al, Canada

3. Rôle de l'étudiant dans cet article

Annie Major a effectué la grande majorité des expériences menant aux résultats présentés dans cet article. Elle a rédigé une 1^{ère} version complète de l'article soumis au JEVT. En dehors de Sophie Lerouge, les autres co-auteurs ont eu un rôle très minime dans cet article. On peut donc évaluer le pourcentage d'Annie Major à 70% pour cet article.

 18-juin 2006

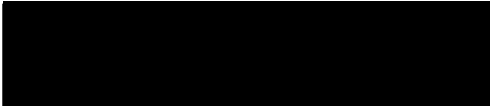
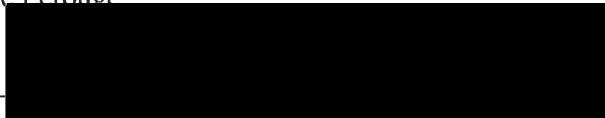
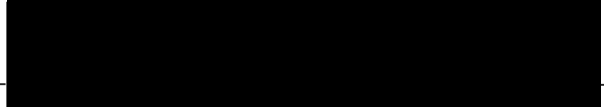
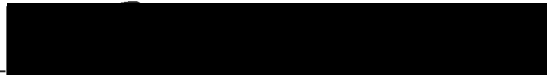
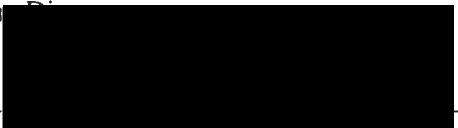
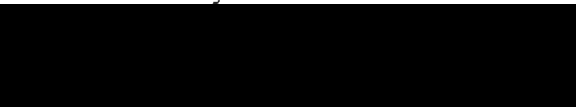




Sophie Lerouge (directeur) Date

 28/6/2006

Marie-Josée Hébert (codirecteur) Date

4. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour qu' Annie Major inclue cet article dans son mémoire qui a pour titre : « Analyse des mécanismes d'échec des endoprothèses couvertes et stimulation de la formation néointimale : vers un meilleur traitement des anévrismes de l'aorte abdominale. »

	06-12-2005
Sophie Lerouge	Date
	2 dec 2005
Robert Guidoin	Date
	5 dec 2005
Yvan Douville	Date
	6 dec 2005
Guy D.	Date
	6-12-2005
Louis A. Gaboury	Date
	6 décembre 2005
Guy Cloutier	Date
	6-12-2005
Gilles Soule	Date
	6/12/2005
Marc Sanev	Date
	6/12/05
Robert H. Geerkerken	Date
	Dec 12 2005
Paul Petrsek	Date

B) Permission de l'éditeur de la revue**1. Identification de la revue ou du livre****Journal of Endovascular Therapy**

1828 E. Highland Ave. #F104-605
Phoenix, AZ, USA
85016

Publié dans le : Journal of Endovascular Therapy (JEVT) en août 2006

2. Identification de l'éditeur ou des éditeurs

Madame Rebecca Bowman

3. Identification de l'article

Implant Degradation and Poor Healing After Endovascular Repair of Abdominal Aortic Aneurysms: An Analysis of Explanted Stent-Grafts

Annie Major, Robert Guidoin, Ph.D., Gilles Soulez, M.D., Louis A. Gaboury, M.D., Guy Cloutier, Ph.D., Marc Sapoval, M.D., Yvan Douville, M.D., Guy Dionne, M.D., Robert H. Geelkerken, M.D., Paul Petrasek, M.D., and Sophie Lerouge, Ph.D.

L'étudiante **Annie Major** est autorisé à inclure l'article ci-dessus dans son mémoire qui a pour titre « Analyse des mécanismes d'échec des endoprothèses couvertes et stimulation de la formation néointimale : vers un meilleur traitement des anévrismes de l'aorte abdominale. »

Voir la page suivante, soit l'autorisation de l'éditeur

JOURNAL OF ENDOVASCULAR THERAPY.

An official publication of the
INTERNATIONAL SOCIETY OF
ENDOVASCULAR SPECIALISTS

Permission to Reprint

All materials in the *Journal of Endovascular Therapy* (formerly the *Journal of Endovascular Surgery*) are the property of the copyright holder: the INTERNATIONAL SOCIETY OF ENDOVASCULAR SPECIALISTS (ISES). No part of the publication may be reproduced, stored, or transmitted in any form or by any means electronic or mechanical without the written permission.

Name Annie Major Organization University of Montreal

Address _____

City Montreal State/Province _____

Country Canada Zip/Postal Code _____

This request covers the following material from:

Volume 13 Number _____ Year 2006 Pages 457-467

Title Implant degradation and poor healing after endovascular treatment of abdominal aortic aneurysm: an analysis of explanted stent-grafts.

Item(s): ☒ Entire article Number of copies to be reproduced _____

OR ☐ Figures _____ ☐ Tables _____ ☐ Other _____

Material will be reprinted in ☒ Print ☒ Electronic format

This material will be used for ☐ Promotion ☒ Teaching ☒ Research

Article or other publication: thesis

Other _____

Permission to reprint the above material is granted. Please credit the *Journal of Endovascular Therapy* (INTERNATIONAL SOCIETY OF ENDOVASCULAR SPECIALISTS) for original publication.

Rebecca Bowman, Managing Editor

Date: September 6, 2006

EDITORIAL OFFICE

Journal of Endovascular Therapy
1923 E. Highland Ave., #F104-B05
Phoenix, AZ 85016 USA
Telephone: 1-802-850-1331
Fax: 1-802-850-1345
Website: www.jevt.org

EDITORS-IN-CHIEF

Edward B. Dietrich, MD
Thomas J. Fogarty, MD

MANAGING EDITOR

Rebecca Bowman
E-mail: editor@jevt.org

Annexe 9- ACCORD DES COAUTEURS ET PERMISSION DE L'ÉDITEUR (Article II)

Nitrogen-Rich Coating to Promote Healing Around Stent-Graft After Endovascular Repair

A) Déclaration des coauteurs d'un article**1. Identification de l'étudiant et du programme**

Annie Major,

GBM, Génie Biomédical

2. Description de l'article

Soumis dans le : Biomaterials

Nitrogen-Rich Coating to Promote Healing Around Stent-Graft After Endovascular Repair

Sophie Lerouge^{1,2}, Annie Major¹, Pierre-Luc Girault-Lauriault³, Marc-André Raymond¹, Patrick Laplante¹, Gilles Soulez², Michael R. Wertheimer³, Fackson Mwale⁴, Marie-Josée Hébert¹

¹ Research Center, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montréal, Qc, Canada

² Department of Radiology, Institut de Génie Biomédical, Université de Montréal, Montreal, Qc, Canada

³ Department of Engineering Physics, École Polytechnique, Montréal, Qc, Canada

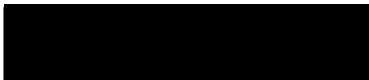
⁴ Lady Davis Institute and Department of Surgery, McGill University, Montréal, Qc, Canada

3. Rôle de l'étudiant dans cet article

Annie Major a effectué presque la totalité des expérimentations décrites dans cet article (la totalité des expérimentations cellulaires in vitro, ainsi qu'une partie de la caractérisation des surfaces (angle de contact). Elle a participé à la rédaction de l'article, qui a été rédigé principalement par Sophie Lerouge. On peut donc évaluer son pourcentage à 60% pour cet article.


Sophie Lerouge (directeur)

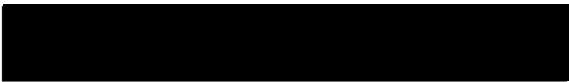
19 juin 2006
Date


Marie-Josée Hébert (codirecteur)

2006/6/28
Date

4. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour qu'Annie Major inclue cet article dans son mémoire qui a pour titre : « Analyse des mécanismes d'échec des endoprothèses couvertes et stimulation de la formation néointimale : vers un meilleur traitement des anévrismes de l'aorte abdominale. »


Sophie Lerouge19 juin 2006
Date
Pierre-Luc Girard-Lauriault2006-06-20
Date
Marc-André Raymond28/6/6.

Date


Patrick Laplante28/6/6

Date


Michel R. Wertheimer15/8/2006

Date


Fackson Mwale2006-06-19

Date


Marie-Josée Hébert28/6/2006

Date

B) Permission de l'éditeur d'une revue ou d'un livre**1. Identification de la revue ou du livre****Biomaterials**

University of Liverpool, Duncan Building
Royal Liverpool University Hospital
Liverpool, UK
L69 3BX,

Soumis le : 1^{er} mars

2. Identification de l'éditeur ou des éditeurs

Madame Peggy O'Donnell

3. Identification de l'article

Nitrogen-rich coating to promote healing around stent-graft after endovascular repair

Sophie Lerouge^{1,2}, Annie Major¹, Pierre-Luc Girault-Lauriault³, Marc-André Raymond¹, Patrick Laplante¹, Gilles Soulez², Michael R. Wertheimer³, Fackson Mwale⁴, Marie-Josée Hébert¹

L'étudiante **Annie Major** est autorisée à inclure l'article ci-dessus dans son mémoire qui a pour titre « Analyse des mécanismes d'échec des endoprothèses couvertes et stimulation de la formation néointimale : vers un meilleur traitement des anévrismes de l'aorte abdominale. »

Voir la politique du journal pour les droits d'auteur à la page suivante

- * How do I obtain a Copyright Transfer Form?
- * Can I post my article on the Internet?
- * What rights do I retain as author?
- * Why does Elsevier request transfer of copyright?
- * Why does Elsevier believe it needs exclusive rights?
- * Obtaining permission to use Elsevier material
- * How do I obtain permission from other publishers?
- * Where should I send requests for permission that I receive from other authors?
- * Can you provide me with a PDF file of my article?
- * What is Elsevier policy on using patient photographs?

How do I obtain a Copyright Transfer Form?

You will receive a form automatically by e-mail or post once your article is received by Elsevier's Production Department.

Can I post my article on the internet?

You can post your version of your article on your personal web page or the web site of your institution, provided that you include a link to the journal's home page or the article's DOI and include a complete citation for the article. This means that you can update your version (e.g. the Word or Tex form) to reflect changes made during the peer review and editing process.

What rights do I retain as author?

As an author, you retain rights for large number of author uses, including use by your employing institute or company. These rights are retained and permitted without the need to obtain specific permission from Elsevier.

- * the right to make copies of the article for their own personal use, including for their own classroom teaching use;
- * the right to make copies and distribute copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g. via an e-mail list or list serve);
- * the right to post a pre-print version of the article on Internet web sites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites - see also our information on electronic preprints for a more detailed discussion on these points.
- * the right to post a revised personal version of the text of the final article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on the author's personal or institutional web site or server, with a link to the journal home page (on elsevier.com);
- * the right to present the article at a meeting or conference and to distribute copies of such paper or article to the delegates attending the meeting;
- * for the author's employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of the author's employment, the right to use all or part of the information in (any version of) the article for other intra-company use (e.g. training);
- * patent and trademark rights and rights to any process or procedure described in the article;
- * the right to include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially);
- * the right to use the article or any part thereof in a printed compilation of works of the author, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of the article in the journal); and
- * the right to prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal.

Other uses by authors should be authorized by Elsevier through the Global Rights Department, and authors are encouraged to let Elsevier know of any particular needs or requirements.

Why does Elsevier request transfer of copyright?

Elsevier wants to ensure that it has the exclusive distribution right, for all media. Such a right can be obtained through an exclusive license from authors, but there is virtually no difference between transfer and exclusive license. Given that there is virtually no difference, it seems to us that transfer does give an advantage in the